

10) BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

17) **Offenlegungsschrift**
11) **DE 39 10323 A 1**

21) Aktenzeichen: P 39 10 323.4
22) Anmeldetag: 30. 3. 89
41) Offenlegungstag: 19. 10. 89

51) Int. Cl. 4
C 12 N 1/20
C 12 N 1/14
C 12 N 15/00
C 12 P 19/34
C 12 P 21/00
C 07 H 21/04
C 07 K 15/04
C 07 K 15/14
A 61 K 37/02
// C 07 K 3/14, 3/20,
3/22, 3/24, 3/26
(C 12 P 21/00,
C 12 R 1:19)

DE 39 10323 A 1

30) Unionspriorität: 32) 33) 31)
31.03.88 GB 07803/88

71) Anmelder:
Glaxo Group Ltd., London, GB

74) Vertreter:
Zumstein, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Klingseisen, F.,
Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

72) Erfinder:
Dayer, Jean-Michel, Genf/Genève, CH; Seckinger,
Philippe Lucien, Carouge, CH

54) **Biologisch aktive Proteine**

Es werden neue Proteine mit selektiver Tumor Necrose Faktor (TNF)-inhibitorischer (hemmender) Aktivität, Verfahren zu ihrer Herstellung, pharmazeutische Formulierungen davon und die Verwendung derselben in der Medizin beschrieben.

DE 39 10323 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein neues Protein mit einem inhibitorischen Effekt gegen Tumor Necrose Faktor α -vermittelte Aktivität, die Isolierung und Reinigung eines solchen Proteins aus natürlichen Quellen, seine Herstellung durch DNA-Manipulation und die Verwendung eines solchen Proteins bei der Behandlung von Zuständen, die mit übermäßiger oder unregelmäßiger TNF α -Produktion zusammenhängen.

Tumor Necrose Faktor (TNF) ist eine Aktivität, die durch eine Familie von mindestens zwei Proteinen, α und β , verkörpert wird, welche cytotoxisch für Tumorzellen sind und ihr Wachstum in Kulturen inhibieren [E. Carswell et. al. "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumours", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, Seite 3666 (1975)]. Der Tumor Necrose Faktor α (TNF α), der auch als "Cachectin" bezeichnet wird, wird hauptsächlich durch Zellen der monocytären/makrophagen-Zelllinie produziert, als Reaktion auf "Streß"-Signale, welche invasive Stimulantien wie Bakterien, Viren, Tumoren und andere Toxine begleiten, TNF β gewöhnlich als "Lymphotoxin" bezeichnet, wird hauptsächlich durch Lymphoidzellen produziert. TNF β hat viele Aktivitäten, ähnlich denjenigen von TNF α , jedoch scheint es weniger wirksam zu sein, obwohl dies das Ergebnis von Schwierigkeiten bei der Herstellung von reinem TNF β sein kann.

TNF α vermittelt und nimmt teil in einem weiten Bereich von biologischen Aktivitäten [B. Beutler et. al., "Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin", Nature, 316, Seite 552 (1985)], wobei einige von ihnen mit Interleukin 1 (IL-1) [J. Le et. al., "Tumour necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities", Laboratory Invest, 56, Seite 234 (1987)] gemeinsam sind. Erhöhte Spiegel von TNF α , die beispielsweise durch Tumorzellen induziert sind, können zu Gewichtsverlust und Kachexie führen und TNF α wurde auch als hauptsächlicher Faktor von endotoxischem Schock (septischer Schock) angesehen, was tödlich sein kann. Andere biologische Wirkungen von TNF α umfassen Hypotension, Fieber (induziert durch Stimulierung von hypothalamischer Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Synthese, Koagulopathie (induziert durch Stimulierung der vaskulären Endothelzellen, welche beispielsweise den Gewebefaktor freisetzen) und Gewebezerrörung (induziert beispielsweise durch Stimulierung einer Reihe von Proteinasen, einschließlich Collagenaseproduktion durch Dermalfibroblasten und Synovialzellen) [C. Dinarello et. al., "Tumour necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1", J. Exp. Med., 163, Seite 1433 (1986); J. Dayer et. al., "Cachectin/tumour necrosis factor stimulate collagenase and prostaglandin E₂ production by human dermal fibroblasts and synovial cells", J. Exp. Med., 162, Seite 2163 (1985)].

Es besteht daher ein Bedürfnis zur Entwicklung eines Cachectin/TNF α -Inhibitors, der dem endotoxischen Schock, Kachexie und den anderen oben beschriebenen schädlichen Wirkungen vorbeugt bzw. sie verhindert. Es wurde gezeigt, daß die passive Immunisierung von Tieren gegen Cachectin dem Endotoxin-induzierten Tod, vermittelt durch die TNF α -Antikörper [B. Beutler et. al., Nature, 316, supra] vorbeugen bzw. ihn verhindern kann.

Es wurde nun ein neues Protein identifiziert, das einen wirksamen inhibitorischen Effekt gegen TNF α -vermittelte Aktivitäten ohne signifikante gleichzeitige Inhibierung der IL-1-vermittelten Aktivität besitzt. Das Protein wird im folgenden als Tumor Necrose Faktor α -Inhibitor (TNF α -INH) identifiziert.

So wird gemäß einem Aspekt der Erfindung ein Protein geschaffen, das Tumor Necrose Faktor α -vermittelte Aktivität selektiv inhibiert.

Wie hier verwendet, wird die selektive Inhibierung, wie durch den erfindungsgemäßen Inhibitor gezeigt, identifiziert als die Fähigkeit, TNF-vermittelte Aktivität zu blockieren, während die Fähigkeit fehlt, andere Proteine, welche mit dem TNF bestimmte, jedoch nicht alle der biologischen Aktivitäten des TNF wie IL-1 gemeinsam haben, zu blockieren.

Vorzugsweise ist der Tumor Necrose Faktor α -Inhibitor gemäß der Erfindung in im wesentlichen homogener Form, im wesentlichen frei von größeren Verunreinigungen und/oder im wesentlichen frei von anderem Proteinmaterial.

Von dem Tumor Necrose Faktor α -Inhibitor gemäß der Erfindung wurde gefunden, daß er eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften hat:

- (a) ein Molekulargewicht im Bereich von 40 bis 60 kDa, bestimmt durch Molekularsiebchromatographie;
- (b) einen isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich von 5,5 bis 6,1, bestimmt durch Chromatofokussierung;
- (c) Hemmung der Standard-TNF-Bestimmung verschiedener Cytotoxizität für Murin L929-Zellen, die mit Actinomycin D behandelt sind, wie beschrieben von G. Nedwin et. al., "Effects of interleukin 2, interferon γ and mitogens on the production of tumour necrosis factors α and β ", J. Immunol., 135, Seite 2492 (1985). Diese Hemmung kann durch weitere Zugabe von TNF α überwunden werden, was anzeigt, daß die Hemmung kompetitiv ist. Der Inhibitor ist auch ein Inhibitor der TNF β -Aktivität, obwohl die Hemmung von TNF α bei dieser Bestimmung wirksamer ist als diejenige von TNF β ;
- (d) Hemmung der TNF-induzierten PGE₂-Freisetzung aus menschlichen Fibroblasten und Synovialzellen;
- (e) Der Inhibitor beeinflusst störend die Bindung von TNF α an U937-Zellen (eine monocytische Tumorzelllinie), wie gezeigt wird durch Hemmung der Bindung von radioaktiv markiertem TNF α (¹²⁵I-TNF α);
- (f) die Spaltung von vorgeformtem TNF α : U937-Zellkomplex wird angeregt durch den Inhibitor in einer temperaturabhängigen Weise;
- (g) der Inhibitor baut TNF durch proteolytische Spaltung nicht ab;
- (h) der Inhibitor hemmt nicht die IL-1 Rezeptor-Bindungsaktivität, z. B. die Bindung von radioaktiv markiertem IL-1 (¹²⁵I-IL-1 α) an die Murin Thymoma-Subzelllinie EL4-6.1.

Es wurde gefunden, daß das erfindungsgemäße Protein, wenn es weiter gereinigt wird, ein Molekulargewicht von etwa 33 000 Daltons hat, wie bestimmt durch Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-

PAGE).

Als weiterer oder alternativer Aspekt wird daher ein Protein geschaffen, das TNF α -vermittelte Aktivität selektiv inhibiert, das eine oder mehrere der folgenden Eigenschaften hat:

- (a) Ein Molekulargewicht von etwa 33 kDa, bestimmt durch SDS-PAGE;
- (b) einen isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich von 5.5 bis 6.1, bestimmt durch Chromatofokussierung;
- (c) Hemmung der Standard-TNF-Bestimmung von verschiedener Toxizität von Murin L929-Zellen, behandelt mit Actinomycin D, wie beschrieben von G. Nedwin et. al. "Effects of interleukin 2, interferon- γ and mitogens on the production of tumour necrosis factors α and β ", J. Immunol., 135, Seite 2492 (1985). Diese Hemmung kann durch weitere Zugabe von TNF α überwunden werden, was anzeigt, daß die Hemmung konkurrierend ist. Der Inhibitor ist auch ein Inhibitor der TNF β -Aktivität, obwohl die Hemmung von TNF α bei dieser Prüfung wirksamer ist als diejenige von TNF β ;
- (d) Hemmung von TNF-induzierter PGE $_2$ -Freisetzung aus menschlichen Fibroblasten und Synovialzellen;
- (e) der Inhibitor beeinflusst störend die Bindung von TNF α an U937-Zellen (eine monocytische Tumorzelllinie, wie gezeigt durch die Hemmung der Bindung von radioaktiv markiertem TNF α (125 I-TNF α);
- (f) die Spaltung eines vorgeformten TNF α : U937-Zellkomplexes wird durch den Inhibitor in temperaturabhängiger Weise gefördert;
- (g) der Inhibitor baut TNF durch proteolytische Spaltung nicht ab;
- (h) der Inhibitor hemmt nicht die IL-1-Rezeptor-Bindungsaktivität, z. B. die Bindung von radioaktiv markierter IL-1 (125 I-IL-1 α) zu der Murin Thymoma-Subzelllinie EL4-6.1.

Vorzugsweise hat der TNF α -INH gemäß vorliegender Erfindung beide Eigenschaften (a) und (b) und eine oder mehrere der Eigenschaften (c) bis (h).

Insbesondere hat der TNF α -INH der vorliegenden Erfindung alle Eigenschaften (a) bis (h).

Das erfindungsgemäße Protein hat eine aminoterminal Aminosäuresequenz folgendermaßen:

Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-Cys-Asn-Ser-Ile

Es wird ferner angenommen, daß die nächsten drei Aminosäuren eine Glycoxylierungsstelle schaffen und daß die Sequenz sich so fortsetzt:

Asn-Ser-Thr-Lys.

Es sei erwähnt, daß ein TNF α -Inhibitor gemäß der Erfindung eine Aminosäuresequenz umfaßt, im wesentlichen entsprechend der Sequenz von nativem TNF α -INH und enthaltend eine aminoterminal Sequenz, die im wesentlichen mit derjenigen wie oben beschrieben identisch ist. Die Sequenz eines TNF α -Inhibitors gemäß der Erfindung wird demnach identisch sein mit der Sequenz von nativem TNF α -INH oder eine oder mehrere Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversionen oder Additionen allen Ursprungs oder anderweitig enthalten, wobei die sich ergebende Sequenz wenigstens 80% und vorzugsweise 90% Homologie mit der Sequenz von nativem TNF α -INH haben wird und im wesentlichen die gleichen biologischen Eigenschaften des Proteins behalten wird.

Der TNF α -Inhibitor gemäß der Erfindung hat gezeigt, daß er proteinartig ist, indem er durch Erhitzen in Zeit- und Temperatur-abhängiger Weise inaktiviert und durch Behandlung mit Trypsin oder Pronase zerstört wird.

Der TNF α -INH gemäß der Erfindung hat auch gezeigt, daß er ein Glycoprotein ist, da die Behandlung mit dem Enzym Endoglycosidase F das Molekulargewicht um 7 bis 8 kDa vermindert.

Gemäß einem weiteren oder alternativen Aspekt der Erfindung wird somit ein TNF α -Inhibitor, wie hier definiert, geschaffen, der jedoch in im wesentlichen unglycolisiertem Zustand ist.

Die Inhibitoren gemäß der Erfindung sind von Interesse bei der Behandlung von Zuständen, wo es erwünscht ist, die TNF α -Aktivität zu hemmen, beispielsweise solche Zustände, welche von den Wirkungen der TNF kommen, wie Gewichtsverlust, Schock, Kachexie und chronische lokale Entzündungen, rheumatoide Arthritis, disseminierte (gestreute) intravaskuläre Koagulation und Nephritis.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein TNF α -Inhibitor, wie hier definiert, oder ein pharmazeutisch annehmbares Derivat davon geschaffen, zur Verwendung als aktives therapeutisches Mittel, insbesondere bei der Behandlung von Zuständen, die mit übermäßiger oder unregelmäßiger TNF α -Produktion verbunden sind.

Nach einem weiteren oder alternativen Aspekt der Erfindung wird eine Methode zur Behandlung von Zuständen, die mit übermäßiger oder nicht regulierter TNF α -Produktion in einem Säugetier einschließlich des Menschen verbunden sind, geschaffen, umfassend die Verabreichung einer wirksamen Menge eines TNF α -Inhibitors, wie hier beschrieben, oder eines pharmazeutisch annehmbaren Derivats davon.

Gemäß einem weiteren oder alternativen Aspekt der Erfindung wird auch die Verwendung eines TNF α -Inhibitors, wie hier beschrieben, oder eines pharmazeutisch annehmbaren Derivats davon zur Erzeugung eines Arzneimittels zur Behandlung von Zuständen, die mit übermäßiger oder nicht regulierter TNF α -Produktion verbunden sind, vorgesehen.

Für den Fachmann ist ersichtlich, daß die hier angegebene Bezugnahme auf die Behandlung sich auch auf die Prophylaxe erstreckt sowie auf die Behandlung von bestehenden Zuständen oder Symptomen.

Es sei ferner erwähnt, daß die Menge an TNF α -Inhibitor gemäß der Erfindung, die zur Verwendung bei der Behandlung erforderlich ist, nicht nur mit dem Verabreichungsweg variieren wird, sondern auch mit der Natur des zu behandelnden Zustandes und dem Alter und der Kondition des Patienten und letzten Endes ins Ermessen

des behandelnden Arztes oder Veterinärs gestellt ist. Im allgemeinen wird jedoch eine geeignete Dosis im Bereich von etwa 5,0 bis 500 µg per Kilogramm Körpergewicht pro Tag liegen, beispielsweise im Bereich von 30 bis 300 µg/kg/Tag, vorzugsweise im Bereich von 50 bis 150 µg/kg/Tag.

Eine gewünschte Dosis kann zweckmäßig in einer einzigen Dosis gegeben werden oder als verteilte Dosierungen in geeigneten Intervallen verabreicht werden, beispielsweise in zwei, drei, vier oder mehr Unterdosierungen pro Tag.

Während es sein kann, daß zur Verwendung in der Therapie ein TNF α -Inhibitor gemäß der Erfindung als Rohprotein verabreicht werden kann, ist es vorzuziehen, das aktive Protein als pharmazeutische Formulierung darzubieten.

Die Erfindung betrifft ferner eine pharmazeutische Formulierung, die einen TNF α -Inhibitor, wie hier definiert, oder ein pharmazeutisch annehmbares Derivat davon umfaßt, zusammen mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Trägern dafür und gegebenenfalls anderen therapeutischen und/oder prophylaktischen Bestandteilen. Der Träger oder die Träger müssen "annehmbar" sein in dem Sinne, daß sie mit den Bestandteilen der Formulierung verträglich sind und für den Empfänger nicht schädlich sind.

Die erfindungsgemäßen Inhibitoren können daher zur parenteralen Verabreichung (z. B. durch Injektion, zum Beispiel Bolusinjektion oder kontinuierliche Infusion) formuliert sein und können in Einheitsdosisform in Ampullen, vorgefertigten Spritzen, kleinvolumigen Infusionen oder in Multidosisbehältern mit zugesetztem Konservierungsmittel dargeboten werden. Die Zusammensetzungen können solche Formen als Suspensionen oder Lösungen in wäßrigen Trägern annehmen und können Formulierungsmittel enthalten, wie Suspensier-, Stabilisierungs- und/oder Dispergiermittel. Alternativ kann der aktive Bestandteil in Pulverform sein, erhalten durch aseptische Lyophilisierung von sterilem Feststoff oder durch Lyophilisierung aus Lösung zur Zubereitung mit einem geeigneten Träger, z. B. sterilem pyrogenfreiem Wasser vor der Verwendung.

Der TNF α -Inhibitor gemäß der Erfindung kann auch in Kombination mit anderen therapeutischen Mitteln, beispielsweise anderen Cytokinen oder Inhibitoren davon, verwendet werden.

Die Erfindung schafft somit gemäß einem weiteren Aspekt eine Kombination, umfassend einen TNF α -Inhibitor, wie hier definiert, oder ein pharmazeutisch annehmbares Derivat davon, zusammen mit einem anderen therapeutisch aktiven Mittel, beispielsweise anderen Cytokinen oder Inhibitoren davon.

Die erfindungsgemäßen Proteine können hergestellt werden durch Reinigung aus natürlichen Quellen und, falls geeignet, anschließende chemische Modifizierung, oder sie können hergestellt werden durch bekannte übliche Methoden zur Herstellung von Proteinen, beispielsweise durch rekombinante DNA-Techniken.

Gemäß einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung des Tumor Necrose Faktor α -Inhibitors gemäß der Erfindung durch Reinigung aus natürlichen Quellen, besonders Urin von menschlichen Fieberpatienten, geschaffen. Eine solche Reinigung umfaßt beispielsweise Schritte des Konzentrierens des rohen Urins von menschlichen Fieberpatienten, Ausfällen des rohen TNF α -INH aus dem Urin und Fraktionieren des TNF α -INH aus den anderen Proteinen dieses Niederschlags durch eine oder mehrere Maßnahmen, beispielsweise Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltrationschromatographie, Hydrophobizitätschromatographie, Immunoabsorptions- und Affinitätschromatographie auf immobilisiertem TNF α .

Der Tumor Necrose Faktor α -Inhibitor gemäß der Erfindung ist auch erhältlich aus menschlichem makrophagenhaltigem Gewebe, beispielsweise Lungenspülungen und Extrakten von menschlicher Leber, woraus er durch Standardreinigungstechniken wie die oben beschriebenen, erhalten werden kann.

Natürlicher und rekombinanter TNF α -INH, hergestellt gemäß den hier beschriebenen Verfahren, kann durch eine Reihe von Schritten, wie oben erwähnt, gereinigt werden. Nach jedem der Reinigungsschritte kann die Anwesenheit und Reinheit des TNF α -INH in einem Test auf Cytotoxizität in Anwesenheit von Actinomycin D (Acti D) unter Verwendung einer TNF-empfindlichen Zelllinie L929 gemessen werden, wie von G. Nedwin et al., J. Immunol., 135, loc. cit., beschrieben.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird der TNF α -INH zunächst aus unbehandeltem Urin isoliert werden, der von menschlichen Fieberpatienten ($> 38,5^{\circ}\text{C}$), frei von Urininfektionen unter Verwendung einer Standardkonzentrationsstechnik, beispielsweise Ultrafiltration, gesammelt wird. Eine rohe Fraktion kann dann aus dem rohen Urin unter Verwendung von Ammoniumsulfat, beispielsweise durch Zugabe von Ammoniumsulfat, bis zu einer Konzentration von 80% (Gew./Vol.) bei 4°C unter Rühren ausgefällt werden. Vorzugsweise kann das Ammoniumsulfat schrittweise zugesetzt werden und das bei niedrigeren Konzentrationen gefällte Material, z. B. bei 40% (Gew./Vol.), wird verworfen. Das Ammoniumsulfat kann durch Dialyse entfernt und die entstandene Fraktion gereinigt werden, um den TNF α -INH von anderen Proteinen durch eine Vielzahl von chromatographischen Methoden abzutrennen.

So kann das TNF α -INH-Konzentrat durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt werden, wobei Proteine, je nach ihrer Differenz in der elektrischen Ladung, abgetrennt werden, was ein Spiegelbild der Säuren-Baseneigenschaften der Proteine ist. Geeignete Materialien für die Ionenaustauschchromatographie umfassen Aminoethylcellulosederivate, beispielsweise quaternäre Aminoethylcellulose (QAE-Cellulose) oder Diethylaminoethylcellulose (DEAE-Cellulose), welche in weitem Maße im Handel erhältlich sind. Die Anionenaustauschsäule sollte vor der Anwendung des Konzentrats unter Verwendung eines geeigneten Puffers wie Tris-HCl, gegebenenfalls enthaltend ein Chelatmittel wie EDTA, equilibriert werden: Gebundenes Material kann aus der Säule unter Verwendung einer Salzlösung (beispielsweise 0,8 M Natriumchlorid, aufgebracht mit dem Equilibrierungspuffer) eluiert werden.

Die aktiven Fraktionen von der Ionenaustauschchromatographie werden vereinigt. Geeignete Materialien zur Kationenaustauschchromatographie umfassen Derivate der Cellulose wie Carboxymethyl-(CM)-Cellulose oder Sulfopropyl Sepharose (Pharmacia, Uppsala, Schweden). Die Säule sollte mit einem geeigneten Puffer wie Natriumacetat equilibriert sein und gebundenes Material kann mit dem Equilibrierungspuffer, der beispielsweise 0,5 M Natriumchlorid enthält, eluiert werden.

Die vereinigten aktiven Fraktionen werden weiter gereinigt durch Affinitätschromatographie auf gebundenem rekombinantem TNF α (rhTNF α), gekuppelt an eine geeignete Matrix, beispielsweise Mini-Leak Agarose (Kem En Tec, Biotechnology Corp., Dänemark). Die Säule sollte gepuffert sein, unter Verwendung von beispielsweise einem Phosphatpuffer (z. B. 0,8 M Kaliumphosphat pH 8,6). Aktive Gruppen, die nicht an rh TNF α gebunden sind, sollten blockiert werden unter Verwendung von Ethanolamin-HCl pH 8,5 Puffer. Die Säule sollte mit einem geeigneten Puffer, beispielsweise Tris-HCl, gegebenenfalls enthaltend Natriumchlorid, equilibriert werden und der TNF α -INH wird mit einem sauren (pH 3,5) Glycinpuffer eluiert. Die eluierten Fraktionen sollten sofort auf pH 7,0 durch Zugabe von beispielsweise Tris-Base eingestellt werden.

Die aktiven vereinigten Fraktionen werden vorzugsweise vor dem endgültigen Reinigungsschritt der Umkehrphasen-FPLC (Fast-protein-liquid-Chromatographie) lyophilisiert werden. Vor deren Aufbringung auf die FPLC-Säule sollte die lyophilisierte TNF α -INH-Fraktion mit einem geeigneten Puffer wie Trifluoressigsäure (TFA) (Fulka, Buchs, Schweiz), Heptafluorbuttersäure (HFBA) oder Essigsäure gepuffert werden. Die Elution des TNF α -INH aus der FPLC-Säule kann unter Verwendung üblicher Techniken durchgeführt werden, beispielsweise mit einem geeigneten Puffer, wie vorstehend beschrieben, gegebenenfalls enthaltend einen Alkohol, beispielsweise N-Propanol.

Die eluierte Fraktion sollte sofort gepuffert werden, beispielsweise mit Ammoniumbicarbonat und lyophilisiert werden. Der TNF α -INH ist dann in im wesentlichen homogener Form, geeignet zur weiteren Prüfung auf biologische Aktivität und zur Herstellung in einer geeigneten Form zur therapeutischen Verwendung.

Es wird demnach als weiterer oder alternativer Aspekt der Erfindung ein Protein geschaffen, das TNF α -vermittelte Aktivität selektiv hemmt, die im wesentlichen identisch ist mit derjenigen, die nach dem obigen Verfahren erhalten wurde.

Die Fähigkeit, den TNF α -INH der vorliegenden Erfindung bis zur Homogenität zu reinigen, hat die Sequenzierung des N-terminalen Teils dieses Proteinmoleküls ermöglicht. Diese Sequenz nimmt teil beim Klonen eines Gens, das TNF α -INH kodiert, und ermöglicht so die Produktion von großen Mengen von TNF α -INH in reiner Form zur weiteren biologischen Untersuchung und gegebenenfalls zum therapeutischen Testen und zur Verwendung.

Proben von homogenem TNF α -INH gemäß der Erfindung können durch übliche Techniken sequenziert werden, beispielsweise unter Verwendung eines handelsüblichen automatischen Sequenzers, unter Verwendung von entweder Ninhydrin- oder Gasphasenermittlung. Die ersten 17 Reste des aminoterminalen Teils des menschlichen TNF α -INH, wie hier definiert, umfassen die folgende Sequenz:

Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-Cys-Asn-Ser-Ile

(identifiziert unter Verwendung eines automatischen Sequenzers, Modell 477A von Applied Biosystems).

Es wird ferner angenommen, daß die nächsten drei Aminosäuren eine Glycoxylierungsstelle schaffen und daß die Sequenz so fortfährt:

Asn-Ser-Thr-Lys.

Es sei erwähnt, daß eine gute Methode zur Schaffung großer Mengen von TNF α -INH in reiner Form durch rekombinante DNA-Techniken besteht, welche in der Fachwelt gut bekannt sind. Jedoch erfordert die erfolgreiche Anwendung solcher Techniken nicht nur, daß der natürliche und rekombinante TNF α -INH oder seine Aktivität genau gemessen werden, sondern auch daß sowohl das natürliche als auch das rekombinante Produkt bis zur Homogenität gereinigt werden kann.

Gemäß einem noch weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Erzeugung eines Tumor Necrose Faktor-Inhibitors gemäß der Erfindung oder eines Derivats davon geschaffen, durch Expression einer DNA-Sequenz, die einen solchen Inhibitor in einem geeigneten transformierten Wirt kodiert.

Ein solches Verfahren umfaßt das Züchten eines mit Molekülen von rekombinanter DNA transformierten Wirts, umfassend DNA-Sequenzen, die den Inhibitor kodieren, welche in einen geeigneten Vektor eingeschoben worden sind.

Geeignete eukaryotische und prokaryotische Wirte können beispielsweise sein Stämme von Bakterien, Hefen, andere Pilze und tierische Zellen (einschließlich Insektenzellen) und Pflanzenzellen im Gewebe. Besonders bevorzugte Wirtszellen sind Hefezellen, E. coli-Zellen und tierische Zellen.

Die Expression eines Proteins mit Tumor Necrose Faktor-Inhibitor-Aktivität wird erreicht durch Züchten der transformierten Wirtszellen in einem geeigneten Wachstumsmedium. Normalerweise wird ein solches Medium enthalten eine Quelle für Stickstoff wie Ammoniumsulfat, eine Quelle für Kohlenstoff und Energie wie Glucose oder Glycerin, Spurenelemente und Faktoren, die für das Wachstum der besonderen Wirtszellen wesentlich sind. Die genauen Züchtungsbedingungen werden von dem gewählten Wert abhängen; so wird beispielsweise im Falle von E. coli submerse aerobe Fermentation bevorzugt, vorzugsweise bei etwa 37°C.

Zusätzlich kann die Expression induziert werden, beispielsweise durch Zugabe eines Induziermittels oder Verwendung von induzierenden Bedingungen für das Promotorsystem, das in dem Expressionsvektor verwendet wird.

In Abhängigkeit von dem Wirt kann der TNF α -Inhibitor als granulare Inklusionskörper produziert werden, welche nach der Zellyse durch Differentialzentrifugieren gewonnen werden können; diese können durch übliche Methoden solubilisiert und durch hier beschriebene Methoden zur Reinigung des Urin-TNF α -INH gereinigt werden. Alternativ kann der TNF α -Inhibitor in Lösung in dem Cytosol sein, das in den periplasmischen Raum abgegeben oder zweckmäßig in das Kulturmedium abgegeben wird.

Die Wirtszellen werden durch rekombinante DNA-Moleküle transformiert, welche eine DNA-Sequenz ent-

halten, die einen TNF α -Inhibitor kodieren, der in einen Expressionsvektor eingeschoben wurde.

Solche Expressionsvektoren können bestehen aus Segmenten von chromosomalen, nicht-chromosomalen und synthetischen DNA-Sequenzen wie verschiedene bekannte Derivate von SV-40 und bekannte bakterielle Plasmide, beispielsweise "natürliche" Plasmide wie ColE1, pSC101 oder pRSF2124 und Phagen-DNAs oder "künstliche" Plasmide (in vitro konstruiert) wie pBR322, pMB9 oder pAT153. Die Phagen-DNAs umfassen beispielsweise die verschiedenen Derivate von Phagen- λ und andere DNA-Phagen, beispielsweise M13, und andere fadenförmige einsträngige DNA-Phagen. Vektoren, die in Hefen verwendbar sind, umfassen das 2 μ -Plasmid, und solche, die in eukaryotischen Zellen wie tierischen Zellen verwendbar sind, umfassen solche, enthaltend SV-40 Adenovirus und Retrovirus.

Solche Expressionsvektoren können auch durch wenigstens eine Expressionskontrollsequenz charakterisiert werden, welche wirksam an die TNF-Inhibitor-DNA-Sequenz geknüpft werden kann, so daß sie die Expression der geklonten DNA-Sequenz steuert und reguliert. Beispiele von brauchbaren Expressions-Kontrollsequenzen umfassen die lac-, trp-, tac- und trc-Systeme, die hauptsächlichlichen Arbeits- und Promotorregionen des Phagen λ (wie der P_L-Promotor unter der Steuerung des thermolabilen ts cI857-Repressors), die Kontrollregion des fd Mantel-Proteins, die glycolytischen Promotoren von Hefe (z. B. der Promotor für 3-Phosphoglyceratkinase), die Promotoren von Hefe, Säurephosphatase (z. B. Pho 5), die Promotoren von Hefe α -mating-Faktoren und Promotoren, stammend von Polyoma, Adenovirus, Retrovirus und Affenvirus.

Zusätzlich können solche Expressionsvektoren verschiedene Stellen für die Insertion von TNF α -Inhibitor-DNA-Sequenzen gemäß der Erfindung besitzen. Diese Stellen sind durch die spezifische Restriktionsendonuclease charakterisiert, welche sie spaltet. Solche Spaltungsstellen werden vom Fachmann gut erkannt. Der Expressionsvektor und besonders die darin gewählte Stelle zur Insertion eines ausgewählten DNA-Fragments und seine wirksame Verknüpfung an eine Expressionskontrollsequenz wird durch eine Vielzahl von Faktoren bestimmt, einschließlich der Zahl der Stellen, die für ein gegebenes Restriktionsenzym empfindlich sind, die Größe des Proteins, das der Expression unterworfen wird, Verunreinigung oder Bindung des der Expression unterworfenen Proteins durch Wirtszellenproteine, was während der Reinigung schwierig zu entfernen sein kann, der Ort der Start/Stop-Codone und andere Faktoren, die der Fachmann weiß. So ist die Wahl eines Vektors und der Insertionsstelle für eine DNA-Sequenz durch ein Gleichgewicht dieser Faktoren bestimmt, wobei nicht alle Auswahlkriterien für einen bestimmten Fall gleich wirksam sind.

In gleicher Weise werden nicht alle Wirt/Vektor-Kombinationen mit gleicher Stärke bei der Expression der DNA-Sequenzen gemäß der Erfindung funktionieren. Die Auswahl wird getroffen in Abhängigkeit von einer Vielzahl von Faktoren, einschließlich Verträglichkeit des Wirts und Vektors, Leichtigkeit der Gewinnung des gewünschten Proteins, der Expressionscharakteristika der DNA-Sequenzen und der Expressionskontrollsequenzen, die damit wirksam verknüpft sind, oder irgendwelche notwendige Nach-Expressionsmodifikationen des gewünschten Proteins.

Die DNA-Sequenzen der Erfindung, welche bei Expression Proteine mit TNF α -Inhibitor-Aktivität kodieren, können isoliert werden, indem verschiedene DNA-Kartierungen für solche DNA-Sequenzen unter Verwendung einer Reihe von DNA-Proben gescreent werden. Die DNA-Proben können aus dem gereinigten natürlichen Protein hergestellt werden, das als Quelle der Aminosäuresequenzdaten verwendet wird. Das gereinigte natürliche Protein kann beispielsweise aus menschlichem Urin von Fieberpatienten, wie oben beschrieben, hergestellt werden. Degenerierte DNA-Sequenzen, die verschiedene Teile und Fragmente der Aminosäuresequenz kodieren, z. B. in Kombination mit Lathe-Proben, werden verwendet, um die DNA-Proben zu bestimmen.

So werden verschiedene DNA-Kartierungen auf DNA-Sequenzen, welche die TNF α -Inhibitoren der Erfindung kodieren, ausgewählt. Solche Kartierungen umfassen chromosomale Genbanken und cDNA- oder DNA-Kartierungen, hergestellt aus Zelllinien oder Gewebe, welche nachweislich TNF α -Inhibitoren produzieren, wie alveolare Makrophagen oder Lebergewebe. Das Screening kann durch direkte Immunexpression, beispielsweise in λ gt11 oder ähnlichen Systemen, oder, im Falle daß eine TNF α -INH-produzierende Zelle identifiziert wird, durch Identifizieren der TNF α -INH-spezifischen mRNA durch direkte Expression in *Xenopus* oocytes, erfolgen.

Eine Vielzahl von üblichen Cloning- und Selektionstechniken können verwendet werden, um DNA-Sequenzen zu lokalisieren und zu identifizieren, welche bei Expression in einem geeigneten eukaryotischen oder prokaryotischen Wirt die TNF α -Inhibitoren gemäß der Erfindung kodieren. Diese ausgewählten DNA-Sequenzen können selbst als Proben verwendet werden, um andere DNA-Sequenzen, die TNF α -Inhibitoren kodieren, auszuwählen, oder können in geeigneten rekombinanten DNA-Molekülen verwendet werden, um geeignete eukaryotische oder prokaryotische Wirte zur Produktion von TNF α -INH, der durch sie kodiert wird, zu transformieren.

Die Erfindung umfaßt in ihrem Bereich ein- oder doppelsträngige DNA-Sequenzen, welche TNF α -Inhibitoren kodieren, solche Sequenzen enthaltende Vektoren, die zur Transformation eines Wirtsorganismus geeignet sind, und Wirtszellen, die mit solchen DNA-Sequenzen transformiert sind.

Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Protein mit selektiver TNF α -Inhibitor-Aktivität geschaffen, das durch Expression eines Wirts, transformiert mit einer DNA-Sequenz, die ein solches TNF α -Inhibitor-Protein kodiert, erzeugt wird. Die TNF-Inhibitoren der Erfindung, welche durch Expression einer DNA-Sequenz, die solche Inhibitoren in einem transformierten Wirt kodieren, werden demnach identisch mit der Sequenz von nativem TNF α -INH sein oder eine oder mehrere Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversionen oder Additionen allelen Ursprungs oder anderweitig enthalten, die entstandene Sequenz wird mindestens 80% und vorzugsweise 90% Homologie mit der Sequenz von nativem TNF α -INH haben und im wesentlichen die gleichen biologischen Eigenschaften behalten. Insbesondere kann ein TNF-Inhibitor gemäß der Erfindung ein N-terminales Methionin umfassen. Auch kann beispielsweise die DNA-Sequenz gemäß der Erfindung, die TNF α -INH kodiert, in einem Expressionsvektor mit einem Teil einer DNA-Sequenz verschmolzen (integriert) werden, die ein eukaryotisches oder prokaryotisches Polypeptid kodiert, um die Expression von

TNF α -INH, welcher die DNA-Sequenz kodiert, zu unterstützen oder die Sekretion, Reifung oder Reinigung des TNF α -INH von dem Wirt zu fördern; das verschmolzene (integrierte) Polypeptid kann intra- oder extra-cellular durch bekannte Techniken entfernt werden oder der TNF α -INH kann zusammen mit dem integrierten Polypeptid verwendet werden.

Die TNF α -Inhibitoren, die durch Züchten der eukaryotischen und prokaryotischen Wirte, transformiert mit DNA-Sequenzen, die TNF α -Inhibitoren kodieren, erzeugt werden, können dann nach Reinigung in den pharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der Erfindung verwendet werden.

Es sei erwähnt, daß, falls der TNF α -Inhibitor gemäß der Erfindung durch tierische Zellen erzeugt wurde, dieser ein Glycoprotein ist. Prokaryotische Expressionssysteme werden jedoch das Protein in unglykolisiertem Zustand erzeugen. Außerdem kann das glykolisierte Protein durch bekannte Techniken im wesentlichen entglykolisiert werden, beispielsweise durch Verwendung von Endoglykosidase-Enzymen.

Die folgenden nicht-beschränkenden Beispiele erläutern die Erfindung. Alle Temperaturen sind in °C und alle Prozentkonzentrationen in Gew./Vol. angegeben.

TNF α -Hemmtest

Der Prozentsatz an TNF α -INH-Aktivität in den in den Beispielen beschriebenen Fraktionen wurde bestimmt, indem angenommen wurde, daß die Werte für die optische Dichte (OD) von Murin L929-Zellen, die durch Actinomycin D (acti D) stimuliert wurden, einer 100%igen Inhibierung bzw. Hemmung entsprechen, während das OD aus Zellen, die mit Actinomycin D und TNF α gezüchtet wurden, einer maximalen Zellmortalität von 0% TNF α -Inhibierung entsprach. Die in dem Versuch verwendete TNF α war rekombinante menschliche TNF α (rhTNF α), erzeugt in E. coli, wie von A. Marmenout et al., "Molecular cloning and expression of human tumour necrosis factor and comparison with mouse tumour necrosis factor", Eur. J. Biochem., 152, Seite 515 (1985) beschrieben. Demnach wurde der Prozentsatz an TNF α -Inhibierung in dem Cytotoxizitätstest gemäß der Formel (I) berechnet:

Prozentsatz an TNF α -INH-Aktivität =

$$100 \times \left[\frac{(\text{OD mit acti D} + \text{rhTNF}\alpha + \text{TNF}\alpha\text{-INH}) - (\text{OD mit acti D} + \text{rhTNF}\alpha)}{(\text{OD mit acti D}) - (\text{OD mit acti D} + \text{rhTNF}\alpha)} \right] \quad (I)$$

Beispiel 1

Reinigung von Urin-TNF α -INH

a) Konzentration von Protein aus menschlichem Urin

Menschlicher Urin (15 Liter) wurde frisch erhalten aus einem Pool von 5 Patienten vor irgendeiner Behandlung. Zwei der Patienten litten an kleinzelligem Carcinom, einer an maligner Histocytose, einer an Polymyocitis und einer an Sepsis. Alle waren hoch fiebernd (> 38,5°C) und waren frei von Harnwegsinfekten. Der Urin wurde bei 4° auf einem Amicon Ultrafiltrationshohlfaserapparat konzentriert, mit einem Abschneiden (Abspaltung) der Molekülgröße von etwa 5 kDa.

b) Fällung des Proteins aus menschlichem Urin

Die Ansammlung von konzentriertem Urin wurde mit festem Ammoniumsulfat gesättigt, indem das Sulfat langsam unter gleichmäßigem Rühren bei 4° zugesetzt wurde, bis eine Ammoniumsulfatkonzentration von 40% erreicht war. Der Niederschlag wurde durch Zentrifugieren entfernt, verworfen, und der Überstand wurde durch Zugabe von weiterem Ammoniumsulfat auf 80%ige Sättigung eingestellt. Durch Zentrifugieren wurde ein Pellet erhalten, das in 150 ml 20 mM Natriumphosphat (pH 7,2) und 150 mM Natriumchlorid wieder suspendiert wurde. Das Ammoniumsulfat wurde durch Dialyse bei 4° unter Verwendung von 10 mM Tris-HCL pH 7,4, 2 mM EDTA und 5 mM Benzamidin-HCL entfernt.

c) Identifizierung von TNF α -INH-Aktivität

Die halb-gereinigte Fraktion von Beispiel 1(b) wurde in einem Cytotoxizitätstest mit der TNF-empfindlichen Zelllinie L929 in Anwesenheit von Actinomycin D getestet. Bei einer Verdünnung von 1 : 20 der halb-gereinigten Fraktion wurde totale Hemmung des cytotoxischen Effekts, induziert durch rhTNF α , beobachtet, so daß der OD_{570 nm}-Wert identisch war mit demjenigen, der in Anwesenheit von Actinomycin D allein (OD_{570 nm} = 1,5) gemessen wurde.

Weiterhin wurde die inhibitorische Aktivität (Hemmkonzentration) in Verdünnungen der Fraktion bis zu 1 : 160 an Zellen (OD_{570 nm} = 0,83) beobachtet, während der Kontrollwert von rhTNF α bei einer Endkonzentration von 0,2 ng/ml, gemessen in Anwesenheit von Actinomycin D, niedriger war (OD_{570 nm} = 0,73), so daß 50% Hemmung beobachtet wurde, bei einer Verdünnung von etwa 1 : 100 (OD_{570 nm} = 1,10). Der TNF α -INH hatte keine Wirkung auf die Zellenlebensfähigkeit, wenn ohne Actinomycin D getestet wurde.

d) Vergleich der Wirkung von TNF α -INH auf TNF α - und - β -induzierte Cytotoxizität

Ein Cytotoxizitätstest wurde durchgeführt unter Verwendung der TNF-empfindlichen Zelllinie L929 in Anwesenheit von Actinomycin D, unter Verwendung eines Konzentrationsbereichs von TNF α oder TNF β , um den cytotoxischen Effekt zu induzieren. Die halb-gereinigte Fraktion von Beispiel 1(b) wurde bei Verdünnungen von 1 : 20, 1 : 50 und 1 : 80 getestet. Die Kontrolltests wurden in Abwesenheit von TNF α - oder TNF β -Cytokine und in Abwesenheit des Inhibitors durchgeführt. Die Ergebnisse sind unten in der Tabelle 1 gezeigt und veranschaulichen, daß der erfindungsgemäße Inhibitor einigen inhibitorischen Effekt (Hemmwirkung) auf die TNF β -vermittelte Cytotoxizität im Bereich von etwa 50% bis hinunter zu 2% der TNF α -Hemmung mit steigender TNF β -Konzentration hat.

Tabelle 1

15	Endkonzentration von TNF (α oder β) (pg/ml) zugesetzt zu Actinomycin-D- behandelten L929-Zellen	Form von Cytokine, zugesetzt zu den Zellen	Endverdünnung von Sephacryl S-200-inhibierungsfraction auf L929-Zellen (OD _{570 nm})			
			keine	1/20	1/50	1/80
20	0	0	> 1,90	> 1,90	> 1,90	> 1,90
	10	α	ND	ND	ND	ND
		β	1,16	1,66	1,46	1,39
25	20	α	1,30	> 1,90	1,72	1,68
		β	1,02	1,51	1,21	1,22
	50	α	1,02	> 1,90	1,72	1,68
β		0,65	1,03	0,84	0,68	
30	100	α	0,73	1,78	1,69	1,51
		β	0,37	0,71	0,59	0,52
	250	α	0,38	1,70	1,70	1,33
β		0,24	0,44	0,31	0,24	
35	500	α	0,30	1,52	1,49	1,11
		β	0,17	0,30	0,26	0,18
	1250	α	0,19	1,09	1,10	0,76
β		0,11	0,13	0,19	0,13	
40	2500	α	0,06	1,03	0,80	0,47
		β	ND	ND	ND	ND

Beispiel 2

Gelfiltration von Urin-TNF α -INH

Der halbgereinigte TNF α -INH gemäß Beispiel 1(b) wurde durch Gelfiltrationschromatographie bei 4° auf einer Sephacryl S-200-Säule (0,9 x 60 cm) (Pharmacia, Uppsala, Schweden), die in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,4), enthaltend 100 mM Natriumchlorid, äquilibriert worden war, gereinigt. Eine Probe der Proteinfraction (20 mg, 0,8 ml) wurde auf die Säule gegeben und mit dem gleichen Puffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 5,4 ml/h eluiert. Fraktionen (1,35 ml) wurden gesammelt und auf TNF α -INH-Aktivität getestet. Die TNF α -INH-Aktivität eluierte aus dem Gel in einem einzigen Peak. Die inhibitorische Aktivität zeigte ein scheinbares Molekulargewicht von 40 bis 60 kDa (vergl. Fig. 1).

Beispiel 3

Chromatofokussierung von Urin-TNF α -INH

Der halbgereinigte TNF α -INH des Beispiels 1(b) wurde bei 4° auf einer Mono-P vorgepackten Säule (HR 5/20, 5 x 200 mm) (Pharmacia, Uppsala, Schweden), die in 25 mM Bis-Tris-Puffer, eingestellt auf pH 7,1 mit Imidodiessigsäure (Fluka, Buchs, Schweiz), äquilibriert war, chromatographisch fokussiert. Eine Probe der Proteinfraction von Beispiel 1(b) (30 mg) wurde auf die Säule gebracht und mit einem Polypuffer 74/Imidodiessigsäure bei pH 4,0 eluiert. Säulenfraktionen (1 ml) wurden bei einer Verdünnung von 1 : 10 auf ihre Wirkung im rhTNF α (0,2 ng/ml)-Cytotoxizitätstest in Anwesenheit von Actinomycin D (1 µg/ml) getestet. Das tatsächliche pH jeder Säulenfraktion wurde mit einem pH-Meter bestimmt, wobei die Hauptmasse der TNF α -INH-Aktivität in den eluierten Fraktionen zwischen pH 5,5 und 6,1 (vergl. Fig. 2) enthalten war. Dies ist ein Äquivalent zu dem pI des TNF α -INH-Proteins.

Beispiel 4

Ionenaustauschchromatographie von Urin-TNF α -INH

Der halbgereinigte TNF α -INH von Beispiel 1(b) wurde durch Anionen-Austauschchromatographie bei 4° auf einer DEAE-Sephadexsäule (2,6 x 20 cm) (Pharmacia, Uppsala, Schweden), die in 10 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0, enthaltend 2 mM EDTA, äquilibriert war, gereinigt. Gebundenes Material wurde aus der Säule mit dem Äquilibrierungspuffer, enthaltend 0,8 M Natriumchlorid, eluiert. Fraktionen (8,0 ml) wurden gesammelt, auf TNF α -INH-Aktivität getestet und die inhibitorischen Fraktionen wurden vereinigt (160 ml) und gegen 10 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,0 (4 x 2 l) dialysiert.

Der TNF α -INH wurde weiter durch Kationen-Austauschchromatographie bei 4° an einer Sulfopropyl-Sephadexsäule (0,8 x 15 cm) (Pharmacia, Uppsala, Schweden), äquilibriert in 10 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,0, gereinigt. Gebundenes Material wurde aus der Säule mit dem 0,5 M Natriumchlorid enthaltenden Äquilibrierungspuffer eluiert. Fraktionen (7,5 ml) wurden gesammelt, auf TNF α -INH-Aktivität getestet und die inhibitorischen Fraktionen wurden vereinigt und auf das 20fache auf einem Amicon-Ultrafiltrationsapparat mit einem Molekülgrößenabschnitt von etwa 10 kDa eingengt.

Beispiel 5

Gelfiltration von Urin-TNF α -INH

Das TNF α -INH-Konzentrat von Beispiel 4 wurde durch Gelfiltrationschromatographie bei 4° auf einer Sephacryl-S-200 Säule (2,6 x 100 cm) (Pharmacia, Uppsala, Schweden), äquilibriert mit 50 mM Tris-HCl pH 7,4-Puffer, enthaltend 100 mM Natriumchlorid, gereinigt. Eine Probe der Proteinfraction aus Beispiel 4 (200 mg) wurde auf die Säule aufgebracht und mit dem Äquilibrierungspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 27 ml/h eluiert. Fraktionen (9,0 ml) wurden gesammelt, auf TNF α -INH-Aktivität getestet und die inhibitorischen Fraktionen wurde vereinigt. Die Säule wurde mit Dextranblau (DB), 2000 KDa; Rinderserumalbumin (BSA), 67 kDa; Ovalbumin (OA), 43 kDa; α -Chymotrypsinogen-A (α CT), 25 kDa; und Ribonuclease A (RNase), 13,5 kDa kalibriert, wie in Fig. 4 gezeigt.

Beispiel 6

Affinitätschromatographie von Urin-TNF α -INH

Eine TNF α -Affinitätssäule wurde hergestellt, indem rekombinante, menschliche TNF α (1,0 mg) auf Mini Leak-Agarose (Kem En Tec, Biotechnology Corp., Dänemark) in 0,8 M Kaliumphosphat-Puffer pH 8,6 gekuppelt wurde. Die verbleibenden, aktiven Gruppen wurden durch Bebrütung in 0,1 M Ethanolamin-HCl-Puffer pH 8,5 blockiert. Das Gel wurde mit 50 mM Tris-HCl pH 7,4-Puffer, enthaltend 100 mM Natriumchlorid, gewaschen (3 x 50 ml). Eine Probe der TNF α -INH-Fractionen aus Beispiel 5 (15 ml) wurde auf die Säule aufgebracht und mit 0,2 M Glycin-HCl pH 3,5-Puffer eluiert. Fraktionen (1,0 ml) wurden gesammelt, sofort durch Zugabe von 1 M Tris (5 bis 40 μ l) auf pH 7,0 eingestellt und auf TNF α -INH-Aktivität getestet.

Beispiel 7

Umkehrphasen-FPLC-Chromatographie von Urin-TNF α -INH

Die TNF α -INH-Fractionen aus Beispiel 6 wurden lyophilisiert, in 0,1% Trifluoressigsäure (2,0 ml) gelöst und auf ProRPC-Umkehrphasen-FPLC-Säule (5 x 20 cm) (Pharmacia, Uppsala, Schweden), äquilibriert in 0,1% Trifluoressigsäure, aufgebracht. Gebundenes Material wurde mit einem 0 bis 100% Acetonitril-Gradienten in 0,1% Trifluoressigsäure bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min eluiert. Zu jeder Fraktion (0,75 ml) wurde 0,5 M Ammoniumbicarbonat (10 μ l) zugesetzt und das eluierte Material wurde lyophilisiert.

Die Umkehrphasen-FPLC-Chromatographie ergab einen größeren Peak entsprechend der TNF α -INH-Aktivität. Die lyophilisierten Fraktionen, welche diese Aktivität enthielten, wurden in 10 mM Tris-HCl pH 7,4-Puffer, enthaltend 2 mM EDTA, gelöst und mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS PAGE) analysiert, wobei die von U. Laemmli et al., Nature, 277, S. 680 (1970), beschriebene Methode angewandt wurde. Es wurde gefunden, daß der TNF α -INH mit einem Molekulargewicht von 33 kDa eluiert (vergl. Fig. 4) wurde. Proben, welche unter nicht-reduzierenden Bedingungen liefen, wurden auf TNF α -INH-Aktivität bei einer Verdünnung von 1:10 auf L929-Zellen in Anwesenheit von 0,15 mg/ml rhTNF α getestet. Die gegen rhTNF α gerichtete Aktivität wanderte mit einem scheinbaren Molekulargewicht, das mit der 33-kDa-Bande auf dem Gel, gelaufen unter reduzierenden Bedingungen, identisch war.

Beispiel 8

Protein-Sequenzierung von Urin-TNF α -INH

Die aus der Umkehrphasen-FPLC-Chromatographie isolierte TNF α -INH-Fraktion wurde im Vakuum eingengt und auf ein hergerichtetes Sequenzierfilter getupft. Das Protein wurde mit einem Applied Biosystems Model 477A-Protein-Sequencer analysiert. Fraktionen von den sequenzierenden Zyklen wurden zur Trockene

eingedampft und in N,N-Diisopropylethylaminacetat und Acetonitril vor der Injektion in eine HPLC-Säule für Restidentifizierung wiedersuspendiert.

Die ersten 17 Aminosäurereste des N-terminalen Endes wurden identifiziert und haben die Sequenz:

5 Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Cln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-Cys-Asn-Ser-Ile.

Es wird weiterhin angenommen, daß die nächsten drei Aminosäuren eine Glykosylierungsstelle darstellen und daß die Sequenz somit sich mit Asn-Ser-Thr-Lys fortsetzt. Diese Sequenz ist nicht deutlich homogen zu irgendeiner Proteinsequenz, die in der NBRF-Proteinsequenzdatenbasis (November 1988) enthalten ist.

10

Beispiel 9

Veranschaulichung, daß TNF α -INH ein Protein ist

15

(a) Zeit- und Temperaturabhängigkeit

Der Sephacryl S-200-gereinigte TNF α -INH gemäß Beispiel 2, erhalten durch Vereinigen der Röhrchen mit den aktiven Fraktionen, wurde auf 56°, 75° und 95° erhitzt. Die TNF α -INH-Aktivität wurde nach 10, 20 und 60 min gemessen und durch Vergleich mit unbehandelten Proben wurde der Prozentsatz an TNF α -INH-Aktivität gemäß Formel (I) errechnet. Die in der folgenden Tabelle 2 angegebenen Ergebnisse zeigen, daß die TNF α -INH-Aktivität in zeit- und temperaturabhängiger Weise sinkt.

20

Hitzeinaktivierung

25

30

35

Temperatur (°C)	Zeit (min)	Prozent TNF α -INH- Aktivität
56	10	100
	20	100
	60	93
75	10	60
	20	26
	60	15
95	10	27
	20	10
	60	13

40

(b) Empfindlichkeit für Trypsinverdauung (digestiver Abbau)

Trypsin (500 μ g) (Sigma, St. Louis, Mo.) in 0,2 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), enthaltend 1 mM Calciumchlorid, wurde zu den vereinigten Fraktionen des Sephacryl S-200-gereinigten Urin-TNF α -INH von Beispiel 2 gegeben und 4 h bei 37°C bebrütet. Ein anderer Anteil von Trypsin (500 μ g) wurde zugesetzt und die Verdauung weitere 20 h fortgesetzt, bei welcher Zeit die Reaktion durch Zugabe von Sojabohnentrypsin-Inhibitor (2 mg) (Sigma, St. Louis, Mo.) beendet wurde. Der Prozentsatz der TNF α -INH-inhibitorischen Aktivität des Trypsinauszugs und der Kontrollprobe wurde bestimmt bei einer Endverdünnung von 1 : 20 des Pools der vereinigten Fraktionen auf L929-Zellen, stimuliert durch rhTNF α in Anwesenheit von Actinomycin D gemäß Formel (I). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 3 aufgeführt.

50

Trypsin-Inaktivierung

55

60

Bedingungen	Prozent an TNF α -INH- Aktivität	OD 570 nm
Puffer allein	0	0,71
Trypsin + Sojabohnen-Trypsininhibitor in Puffer	0	0,70
teilweise gereinigter Sephadex S-200-Urin	61	1,46
teilweise gereinigter Sephadex S-200-Urin, verdaut mit Trypsin	23	1,03

(c) Behandlung mit Harnstoff

65

Der mit Sephacryl S-200 gereinigte TNF α -INH von Beispiel 2 wurde zu 2 M Harnstoff gegeben und ausgiebig bei 4' gegen Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), enthaltend 2 M Harnstoff, dialysiert. Die Dialyse gegen PBS wurde vor der Biobestimmung wiederholt. Es wurde gefunden, daß die TNF α -INH-Aktivität nicht angegriffen war, was anzeigt, daß die inhibitorische Aktivität durch ein Molekül mit niedrigem Molekulargewicht, gebunden

an ein Protein, nicht vermittelt wurde.

Beispiel 10

Veranschaulichung von konkurrierender (kompetitiver) Hemmung

Der Sephacryl S-200-gereinigte TNF α -INH von Beispiel 2 wurde bei einer Verdünnung von 1 : 10 gegen steigende Mengen von rhTNF α auf L929-Zellen getestet. Eine umgekehrte Wechselbeziehung zwischen der Menge an vorhandenem rhTNF α in dem Test und dem Grad der Hemmung wurde beobachtet (siehe Fig. 3). Demnach wird die Hemm-Aktivität kompetitiv durch steigende Konzentrationen an rhTNF α überwunden.

Beispiel 11

Hemmung der TNF α -vermittelten PGE $_2$ -Produktion durch dermale Fibroblasten

Menschliche dermale Fibroblasten wurden bei einer Konzentration von $2,0 \times 10^4$ Zellen/Vertiefung eingebracht und 48 h gezüchtet. Die Zellen wurden dann mit DMEM-Puffer, ergänzt mit 10% FCS als Kontrolle, stimuliert. Zellen wurden auch mit rhTNF α bei Konzentrationen im Bereich von 0,5 bis 5 mg/ml stimuliert, und der Effekt des TNF α -INH aus Beispiel 5 wurde bei drei Verdünnungen (1 : 20, 1 : 50 und 1 : 80) in dem obigen Puffer beobachtet. Nach 72stündiger Bebrütung wurde die PGE $_2$ -Produktion im Überstehenden durch Radioimmunoassay unter Verwendung eines PGE $_2$ -Antiserums [siehe J. M. Dayer et. al., J. Clin. Invest., 67, S. 1385 (1979)] gemessen.

Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 4 gezeigt und veranschaulichen, daß die Fähigkeit von rhTNF α , die PGE $_2$ -Produktion durch dermale Fibroblasten zu stimulieren, durch die Zugabe von TNF α -INH bei allen drei Verdünnungen gehemmt war. Bei einer Verdünnung von 1 : 80 von TNF α -INH war die inhibitorische Aktivität teilweise durch steigende rhTNF α -Konzentrationen überwunden.

Konzentrationen von rhTNF auf menschl. Fibroblasten (pg/ml)	PGE $_2$ -Produktion durch menschl. dermale Fibroblasten (ng/ml)			
	keine Verdünnung von TNF-INH auf Fibroblasten	1 : 80	1 : 50	1 : 20
0	50,6 \pm 7,4	88,8 \pm 5,6	103,0 \pm 8,9	111,0 \pm 9,4
500	160,0 \pm 14,1	126,0 \pm 9,3	115,9 \pm 6,6	113,9 \pm 7,1
2000	331,7 \pm 28,4	217,2 \pm 10,7	156,7 \pm 10,7	115,3 \pm 21,3
5000	381,7 \pm 19,6	257,2 \pm 13,7	253,1 \pm 21,2	221,6 \pm 16,0

Drei verschiedene Versuche wurden mit dem gleichen Stamm von Fibroblasten durchgeführt. Puffer oder TNF α -INH wurde bei verschiedenen Verdünnungen in Anwesenheit oder Abwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an rhTNF α inkubiert. Die PGE $_2$ -Produktion durch gezüchtete, menschliche, dermale Fibroblasten wurde nach 3 Tagen gemessen. Die Werte stellen die dreifachen Mittel der drei Kulturen \pm SEM (N = 3) dar.

Beispiel 12

rhTNF α -Bindungshemmtest

Rekombinante, menschliche TNF α wurde unter Verwendung der Jodogen-Methode von Fraker und Speck jr., Biochem. Biophys. Res. Comm., 80, S. 849 (1978), jodiert. Die spezifische Aktivität von [125]TNF α war $2,2 \times 10^4$ cpm/ng und erzeugte eine einzige Bande mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, wenn durch SDS PAGE analysiert wurde. Die menschliche Makrophagen-Zelllinie U937 in aliquoten Anteilen von 10^6 Zellen wurde 2 h bei 4° in einem Kulturmedium (200 μ l), umfassend RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Schottland), ergänzt mit Streptomycin (100 μ g/ml), Penicillin (100 E/ml), 1,0% Glutamin und 10% foetalem Kalbsserum, und zusätzlich enthaltend 0,04% Natriumazid und 0,5 ng [125]TNF α gezüchtet. Die Bindungshemmung wurde durch Zugabe von verschiedenen Verdünnungen an TNF α -INH (1 : 20, 1 : 200 und 1 : 2000) durchgeführt.

Nicht-spezifische Bindung wurde in Anwesenheit eines 100fachen Überschusses von nichtmarkiertem rhTNF α gemessen und die freie Radioaktivität wurde von dem gebundenen [125]TNF α durch Zentrifugieren durch ein Ölgemisch abgetrennt, wie von Robb et. al., J. Exp. Med., 154, S. 1455 (1981), beschrieben. Zellgebundenes [125]TNF α wurde in einem Gamma-Zähler (LKB, Bromma, Schweden) gemessen und der Prozentsatz der Bindungshemmung wurde nach der Formel (II) bestimmt.

Prozent der Bindungshemmung:

$$100 \times 1 - \left[\frac{\text{cpm mit TNF}\alpha\text{-INH} - \text{cpm nicht-spezifische Bindung}}{\text{cpm Gesamtbindung} - \text{cpm nicht-spezifische Bindung}} \right] \quad (II)$$

Wirkung von TNF α -INH auf [125 I]-TNF α -Bindung an U937-Zellen

- U937-Zellen wurden 1 h bei 20° in dem Kulturmedium von Beispiel 12 in Anwesenheit von entweder [125 I]-TNF α allein oder [125 I]-TNF α mit 100fachen Überschuß an nichtmarkiertem rhTNF α vorgezchtet. Die U937-Zellen wurden dann mit phosphatgepufferter Salzlösung (3 x 50 ml) bei 4° gewaschen. Die in [125 I]-TNF α allein gezüchteten Zellen wurden in vier Ansätze aufgeteilt und mit TNF α -INH aus Beispiel 5 (1 : 20, 1 : 200 und 1 : 2000 Verdünnungen) bzw. mit Puffer allein gezüchtet.
- Es wurde gefunden, daß die spezifische Bindung von [125 I]-TNF α an U937-Zellen bei 4° um 100%, 80% und 35% durch die drei Verdünnungen von TNF α -INH, 1 : 20, 1 : 200 bzw. 1 : 2000, gehemmt wurde (vergl. Fig. 5). Der Kontrollansatz, der kein TNF α -INH enthielt, zeigte keine Hemmaktivität. Es wurde festgestellt, daß die Bindungshemmung der beiden schwächeren Verdünnungen auf 90% bzw. 60% gesteigert wurde, wenn [125 I]-TNF α mit TNF α -INH bei Verdünnungen von 1 : 200 bzw. 1 : 2000 vor der Zellzugabe vorinkubiert wurde.
- Der Versuch wurde wiederholt unter Verwendung von vorinkubierten Zellen in Anwesenheit von [125 I]-TNF α und einem 100fachen Überschuß an nicht-markiertem TNF α , so daß der Prozentsatz der Bindungshemmung für nichtspezifische Bindung korrigiert werden konnte.

Beispiel 14

Spaltung eines vorgeformten TNF α :U937-Komplexes

- U937-Zellen wurden 1 h in Anwesenheit von [125 I]-TNF α , wie in Beispiel 12 beschrieben, vorgezchtet. Die Zellen wurden gewaschen und entweder bei 4° oder 37° in Anwesenheit oder Abwesenheit von TNF α -INH aus Beispiel 5 bebrütet. Es wurde festgestellt, daß Zelloberflächengebundenes [125 I]-TNF α in Anwesenheit von TNF α -INH rascher spaltet als in dessen Abwesenheit, und es wurde weiterhin festgestellt, daß dies in einer Zeit- und Temperatur-abhängigen Weise (siehe Fig. 6) erfolgt.

Beispiel 15

Darstellung, daß TNF α -INH kein Proteolytikum für hrTNF α ist

- [125 I]-TNF α wurde 1 h bei 20° in Anwesenheit von drei verschiedenen Verdünnungen von TNF α -INH (1 : 20, 1 : 200 und 1 : 2000) und in Anwesenheit von Puffer allein bebrütet. Bei Analyse durch SDS PAGE und Autoradiographie wurde festgestellt, daß [125 I]-TNF α als einzige Bande sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von TNF α -INH wandert, was anzeigt, daß der Inhibitor keine proteolytische Wirkung hat.

Beispiel 16

Wirkung von TNF α -INH auf die IL-1-Rezeptor-Bindungsaktivität

- Die Aktivität von TNF α -INH aus Beispiel 5 wurde in dem IL-1/LAF (Lymphozyten-aktivierender Faktor)-Versuch getestet, wenn durch IL-1 α oder IL-1 β induziert wurde [dieser Versuch ist von P. Seckinger et. al., J. Immunol., 139, S. 1541 (1987) für ein IL-1-Inhibitorprotein beschrieben]. Eine Dosis-Reaktion von [3 H]-Thymidin-Einverleibung (entsprechend der Thymozyten-Vermehrung) wurde in bis zu 200 pg/ml-Konzentrationen sowohl von IL-1 α als auch IL-1 β beobachtet. Zugabe von TNF α -INH bei Konzentrationen, von denen beobachtet wurde, daß sie rhTNF α hemmen, hatten keinerlei signifikante Wirkung auf die IL-1-induzierte Thymozyten-Vermehrung, was anzeigt, daß die Hemmung nur für TNF α spezifisch ist.

- Die erhaltenen Ergebnisse sind unter Bezugnahme auf die beigefügten Zeichnungen folgendermaßen erläutert: Fig. 1 zeigt das Urin-TNF α -INH-Aktivitätsprofil der Sephacryl S-200-Gelfiltration. Säulenfraktionen (1 ml) wurden bei einer Verdünnung von 1 : 10 auf die Wirkung in dem rhTNF α (1,0 ng/ml)-Cytotoxizitätstest in Anwesenheit von Actinomycin D (1,0 μ g/ml) getestet (o — o). Die Kurve (—) bedeutet OD_{280 nm} der Fraktionen. Die Balken bedeuten die Zellyse, gemessen durch Farbstoffaufnahme als Reaktion zu Actinomycin D (□) und zu Actinomycin D plus hrTNF α (■) ohne Urin. Die Molekulargewichtsmarker sind Dextranblau (DB), Rinderserumalbumin (BSA), Ovalbumin (OA), α -Chymotrypsinogen (α CT), Ribonuclease A (RNase) und Phenolrot (○-red).

- Fig. 2 zeigt das Urin-TNF α -INH-Aktivitätsprofil der Chromatofokussierung auf einer Mono-P-Säule. Säulenfraktionen (1 ml) wurden bei einer Verdünnung von 1 : 10 auf die Wirkung in dem rhTNF α (0,2 ng/ml)-Cytotoxizitätstest in Anwesenheit von Actinomycin D (1,0 μ g/ml) getestet (o — o). Die Linie (—) bedeutet OD_{280 nm} der Fraktionen und (----) bedeutet ihr pH. Die Balken sind wie in Fig. 1 beschrieben.

- Fig. 3 zeigt die Umkehrbarkeit der TNF α -INH-Aktivität. Die leeren Kreise (o — o) bedeuten OD_{570 nm} gemessen in Anwesenheit von Actin mycin D, rhTNF α mit TNF α -INH; ausgefüllte Kreise (—) bedeuten OD_{570 nm} gemessen in Anwesenheit von Actinomycin und nur rhTNF α , und der Balken () bedeutet OD_{570 nm} in Gegenwart von Actin mycin D (1,0 μ g/ml) allein.

- Fig. 4 zeigt das Elutionsprofil der Sephacryl S-200-Gelfiltration mit gereinigtem TNF α -INH aus Beispiel 5. Säulenfraktionen (9 ml) wurden sterilisiert und bei einer Verdünnung von 1 : 50 gegen rhTNF α (1,0 ng/ml) in Anwesenheit von Actinomycin D (1,0 μ g/ml), in Anwesenheit von Actinomycin D (1,0 μ g/ml) in dem L929-Cytotoxizitätstest getestet (o — o). Die Linie (—) bedeutet OD_{280 nm} der Fraktionen. Die Balken sind wie in Fig. 1

definiert.

Fig. 5 zeigt die SDS PAGE-Analyse von gereinigtem TNF α -INH von Beispiel 7. SDS PAGE wurde wie von U. Laemmli et. al., Nature, 277, loc. cit., beschrieben, durchgeführt. Die Proben wurden auf 15% Polyacrylamid-Gel mit einem 3% Packungsgel geladen, und die Gele wurden mit Silber angefärbt, wie von C. Merrill et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, S. 4335 (1979) beschrieben. Probelaufe unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurden auf biologische Aktivität getestet, indem 2 mm-Scheiben von dem Gel abgeschnitten und die Proteine durch Bebrütung über Nacht in 10 mM Tris-HCl pH 7,4, enthaltend 2 mM EDTA (Gesamtvolumen 200 μ l), eluiert wurden. Die Fraktionen wurden bei einer Verdünnung von 1 : 10 auf L929-Zellen in Anwesenheit von rhTNF α (0,15 ng/ml) getestet.

Fig. 6 zeigt die Wirkung von TNF α -INH auf [125 I]-TNF α -Bindung an U937-Zellen. TNF α -INH wurde bei drei verschiedenen Verdünnungen in Anwesenheit von [125 I]-TNF α mit der U937-Zellenlinie, wie in Beispiel 13 beschrieben, bebrütet. Leere Vierecke (\square — \square) bedeuten Bebrütung in Anwesenheit von TNF α -INH und die leeren Dreiecke (Δ — Δ) bedeuten die Kontrollprobe. Ausgefüllte Symbole bedeuten eine 30minütige Vor-Inkubation von TNF α -INH bei 20° mit [125 I]-TNF α in dem Kulturmedium vor der Zellzugabe.

Fig. 7 zeigt die Spaltung eines vorgeformten TNF α : U937-Komplexes. U937-Zellen wurden mit [125 I]-TNF α vor-inkubiert, gewaschen und mit TNF α -INH, wie in Beispiel 14 beschrieben, entweder bei 4° (\square — \square) oder 37° (\blacksquare — \blacksquare) bebrütet. Bei der angegebenen Zeit wurde die mit der Zelle verbundene Radioaktivität gemessen und der Prozentsatz der spezifischen Bindung bestimmt. Auf dem Diagramm wurde der von der Kontrolle erhaltene Wert ohne den Inhibitor abgezogen von den Werten, die bei den zwei Temperaturen erhalten wurden, so daß 100% dem Wert entsprechen, der ohne Zugabe von TNF α -INH erhalten wurde.

Patentansprüche

1. Ein Protein, das Tumor Necrose Faktor (TNF) α -vermittelte Aktivität inhibiert (hemmt), jedoch andere Proteine, welche mit TNF gewisse, jedoch nicht alle biologischen Aktivitäten von TNF gemeinsam haben, nicht blockiert.
2. Protein, das Tumor Necrose Faktora α -vermittelte Aktivität selektiv hemmt und ein oder mehrere der folgenden Charakteristika hat:

- (a) Ein Molekulargewicht im Bereich von 40 bis 60 kDa, bestimmt durch Molekularsiebchromatographie;
- (b) einen isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich von 5,5 bis 6,1, bestimmt durch Chromatofokussierung;
- (c) Hemmung des Standard-TNF-Tests der Differentialcytotoxizität für Murin L929-Zellen, die mit Actinomycin D behandelt sind;
- (d) Hemmung von TNF-induzierter PGE $_2$ -Freisetzung aus menschlichen Fibroblasten und Synovialzellen;
- (e) der Inhibitor stört bzw. überlagert sich mit der Bindung von TNF α an U937-Zellen (eine monocytische Tumorzelllinie), wie durch Inhibierung der Bindung von radioaktiv markierter TNF α (125 I-TNF α) ersichtlich wird.

- (f) die Spaltung eines vorgebildeten TNF α : U937-Zellkomplexes wird durch den Inhibitor in temperaturabhängiger Weise gefördert;

- (g) der Inhibitor baut TNF durch proteolytische Spaltung nicht ab;

- (h) der Inhibitor hemmt nicht IL-1-Rezeptor-bindende Aktivität, z. B. die Bindung von radioaktiv markiertem IL-1 (125 I-IL-1 α) an die Murin Thymoma-Subzelllinie EL4-6.1.

3. Protein, das selektiv Tumor Necrose Faktora α -vermittelte Aktivität inhibiert (hemmt) und ein oder mehrere der folgenden Charakteristika hat:

- (a) Ein Molekulargewicht von etwa 33 kDa, bestimmt durch SDS-PAGE;
- (b) einen isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich von 5,5 bis 6,1, bestimmt durch Chromatofokussierung;
- (c) Inhibierung des Standard-TNF-Tests der Differential-Cytotoxizität für Murin L929-Zellen, die mit Actinomycin D behandelt sind;

- (d) Inhibierung von TNF-induzierter PGE $_2$ -Freisetzung aus menschlichen Fibroblasten und Synovialzellen;

- (e) der Inhibitor stört (überlagert) die Bindung von TNF α an U937-Zellen (eine monocytische Tumorzelllinie), wie durch Inhibierung der Bindung von radioaktiv markiertem TNF α (125 I-TNF α) ersichtlich;

- (f) die Spaltung eines vorgeformten TNF α : U937-Zellkomplexes wird durch den Inhibitor in temperaturabhängiger Weise gefördert bzw. hervorgerufen;

- (g) der Inhibitor baut nicht TNF durch proteolytische Spaltung ab;

- (h) der Inhibitor hemmt nicht IL-1-Rezeptor-bindende Aktivität, z. B. die Bindung von radioaktiv markiertem IL-1 (125 I-IL-1 α) an die Murin Thymoma-Subzelllinie EL4-6.1.

4. Ein Protein gemäß einem der Ansprüche 2 oder 3 mit den Eigenschaften (a) und (b), zusammen mit einer oder mehreren der Eigenschaften (c) bis (h).

5. Protein gemäß einem der Ansprüche 2 oder 3 mit allen Eigenschaften (a) bis (h).

6. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, das einem natürlich auftretenden TNF α -Inhibitor entspricht.

7. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, mit einer aminoterminalen Aminosäuresequenz folgendermaßen:

Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-Cys-Asn-Ser-Ile.

8. Protein gemäß Anspruch 7, mit einer aminoterminalen Aminosäuresequenz folgendermaßen:

Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-Cys-Asn-Ser-Ile-Asn-Ser-Thr-Lys.

9. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäuresequenz eine oder mehrere Deletionen, Substitutionen, Insertionen, Inversionen oder Additionen allelen Ursprungs oder anderweitig enthält, wobei die sich ergebende Sequenz mindestens 80% Homologie mit dem Stammprotein hat und im wesentlichen die gleichen bioogischen Eigenschaften wie das Stammprotein behält.
10. Protein gemäß Anspruch 9, mit wenigstens 90% Homologie mit dem Stammprotein.
11. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 in einer im wesentlichen homogenen Form.
12. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß es ein rekombinantes Protein ist.
13. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es ein glykosyliertes Protein ist.
14. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß es im wesentlichen in unglykolisiertem Zustand ist.
15. Eine exogene DNA, umfassend eine Nucleotidsequenz, welche ein Protein kodiert, wie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert.
16. Eine cDNA, umfassend eine Nucleotidsequenz, welche ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11 kodiert.
17. Rekombinanter Expressionsvector, umfassend DNA, gemäß einem der Ansprüche 15 oder 16.
18. Wirtszelle, transformiert mit einem Expressionsvektor gemäß Anspruch 17.
19. Verfahren zur Herstellung eines TNF α -INH-Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß eine Zelle gemäß Anspruch 18 gezüchtet und das TNF α -INH-Protein isoliert wird.
20. Rekombinantes Protein, hergestellt nach der Methode von Anspruch 19.
21. Verfahren zur Herstellung eines TNF α -INH-Proteins, umfassend die folgenden Schritte:
 - (a) Konzentration des Urins von Fieberpatienten;
 - (b) Ammoniumsulfatfällung;
 - (c) Anionenaustauschchromatographie;
 - (d) Kationenaustauschchromatographie;
 - (e) Gelfiltration;
 - (f) Affinitätschromatographie; und
 - (g) Umkehrphasen-FPLC.
22. Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es im wesentlichen identisch ist mit dem Protein, das nach dem Verfahren von Anspruch 21 erhalten wurde.
23. Pharmazeutische Formulierung, umfassend einen TNF α -Inhibitor, wie in einem der Ansprüche 1 bis 14 oder Anspruch 22 definiert, oder ein pharmazeutisch annehmbares Derivat davon und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger dafür.
24. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 14 oder Anspruch 22 zur Verwendung in der Therapie.
25. Pharmazeutische Formulierung zur Verwendung bei der Erzeugung eines Arzneimittels zur Behandlung von Zuständen, die mit übermäßiger oder unregelmäßiger TNF α -Produktion einhergehen, dadurch gekennzeichnet, daß diese Formulierung einen TNF α -Inhibitor, wie in einem der Ansprüche 1 bis 14 oder Anspruch 22 definiert, oder ein pharmazeutisch annehmbares Derivat davon umfaßt.

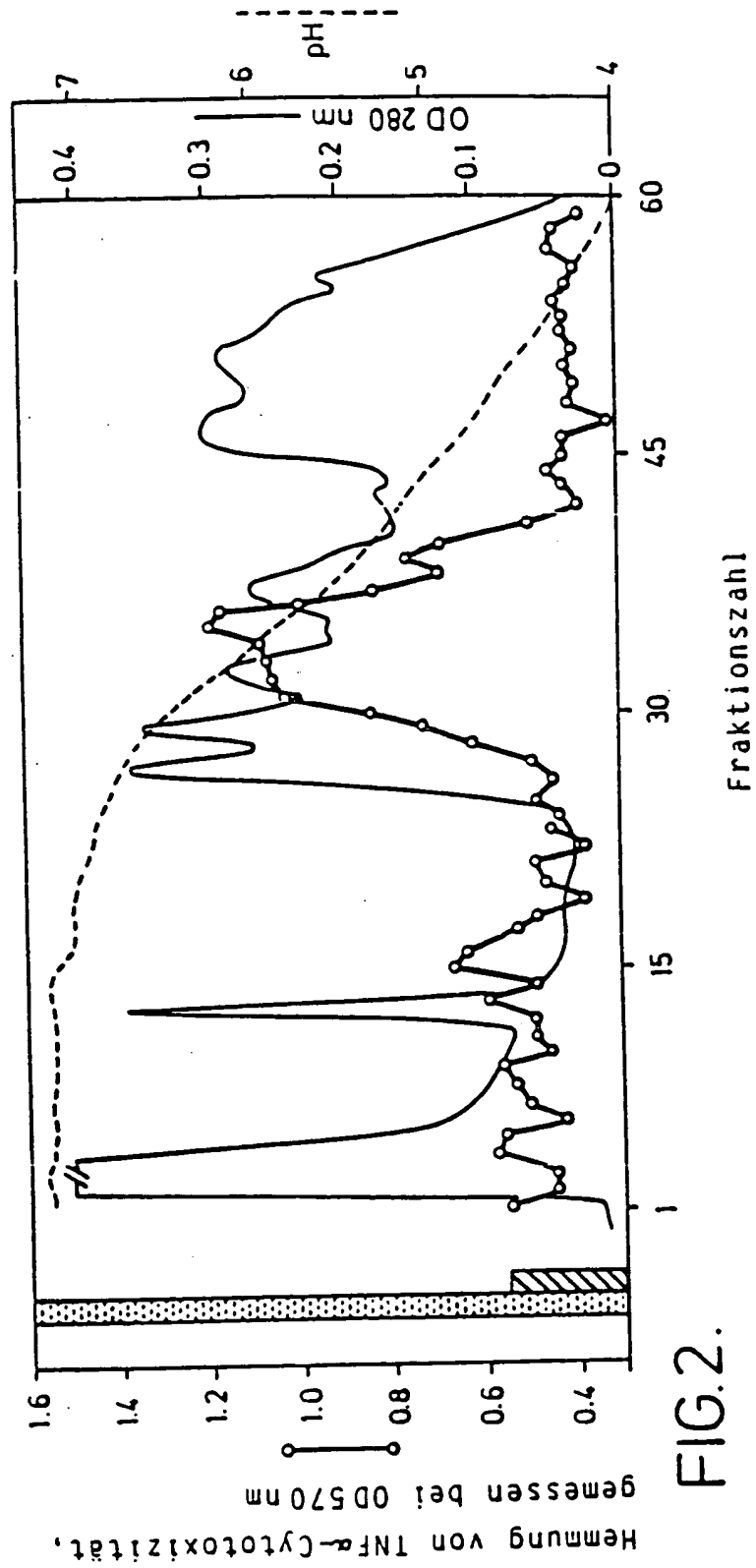
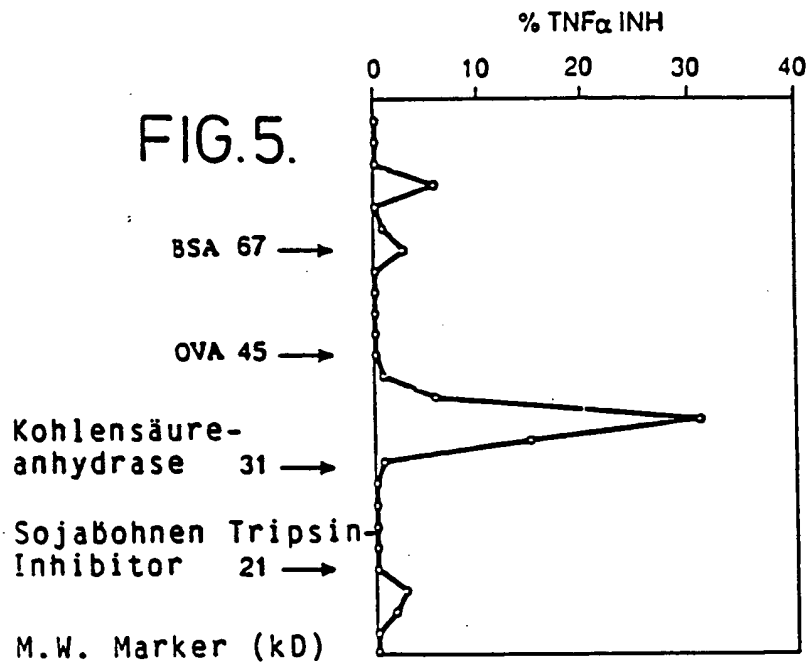
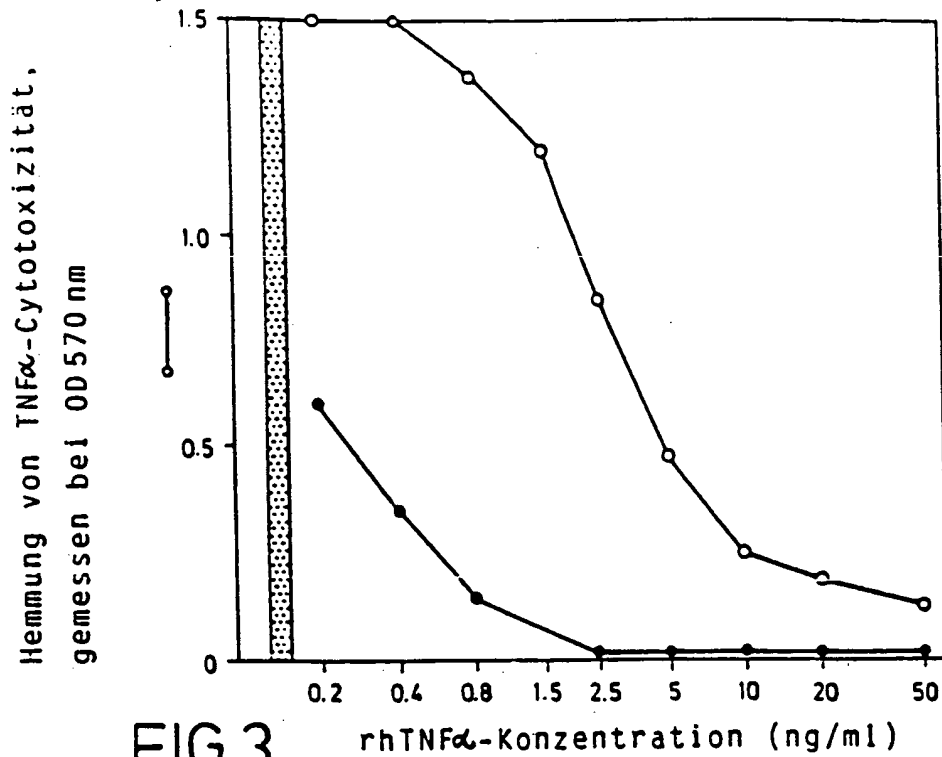


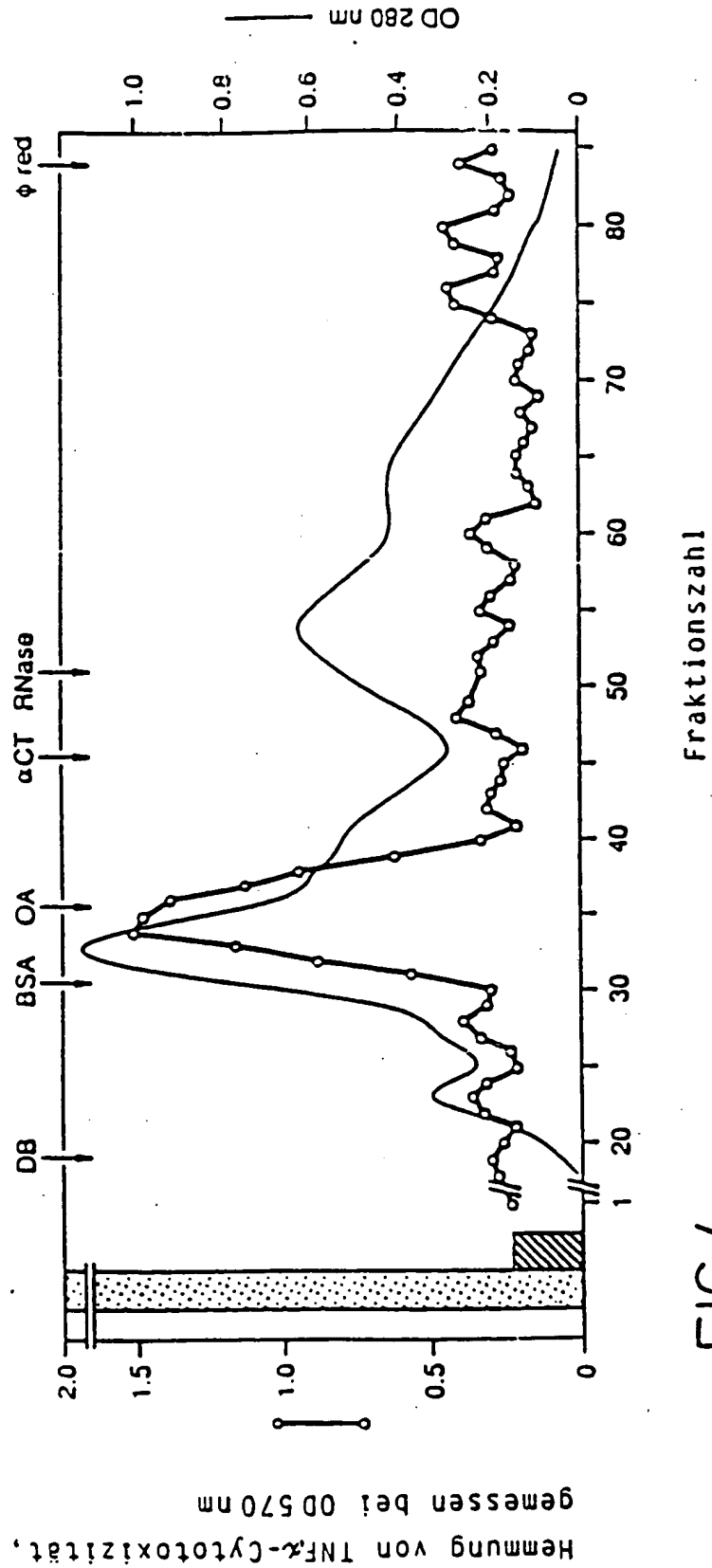
FIG.2.

00-00-00

3910323

44





3910323

46 *

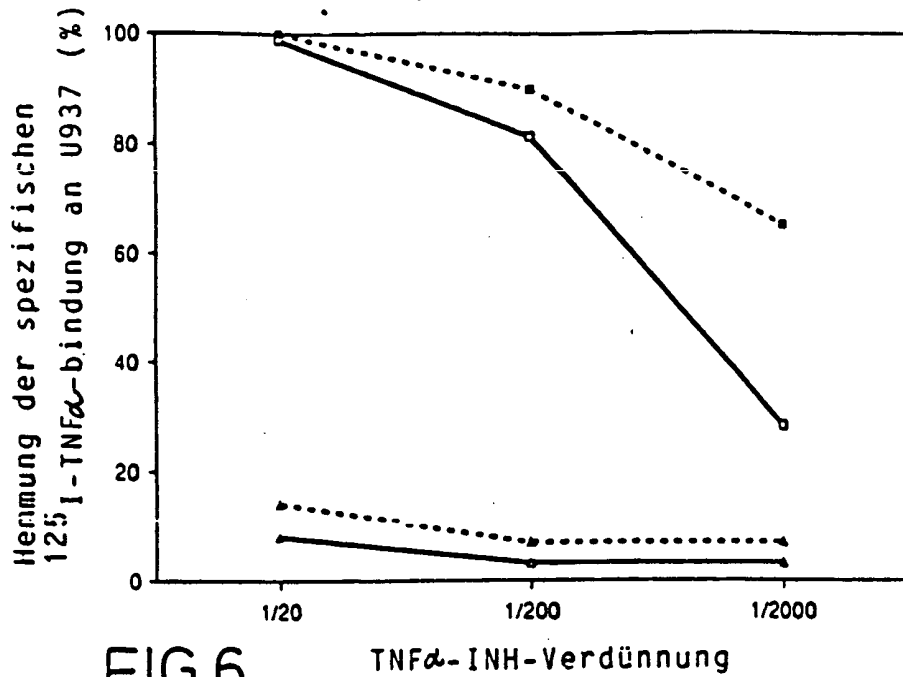


FIG. 6.

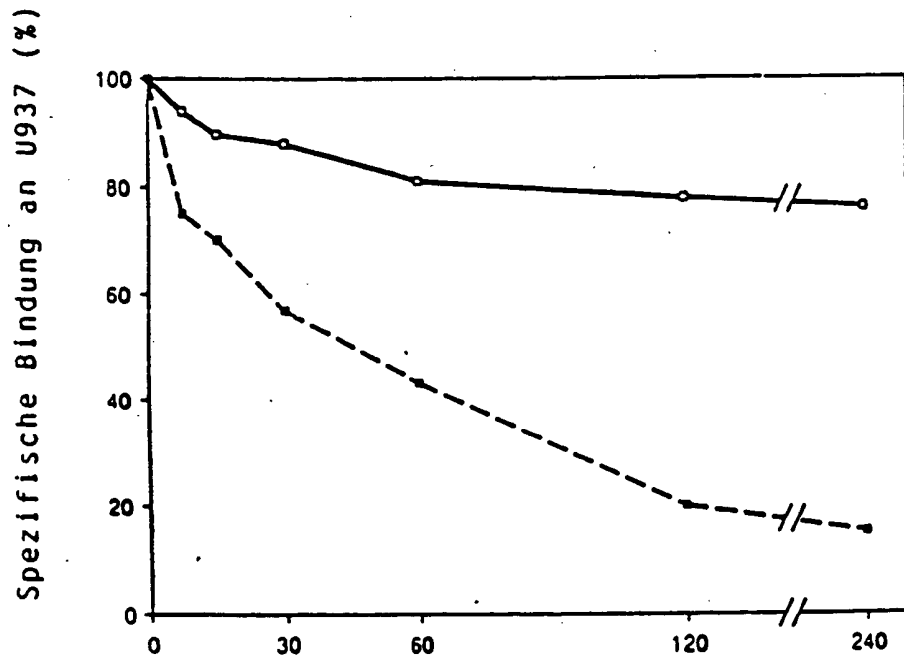


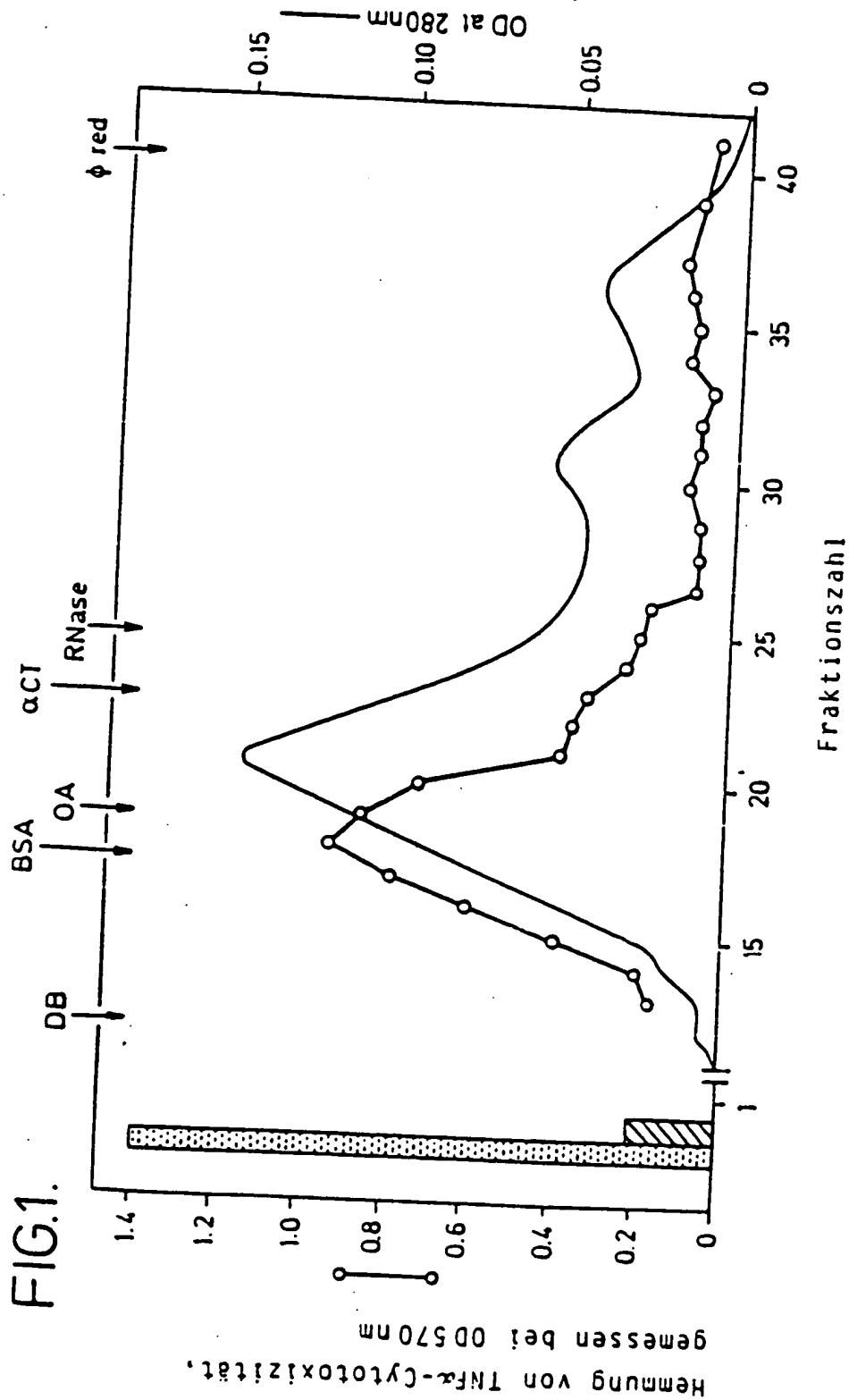
FIG. 7. Zeit nach der TNF α -INH-Zugabe (min)

3910323

Nummer:
Int. Cl.4:
Anmeldetag:
Offenlegungstag:

39 10 323
C 12 N 1/20
30. März 1989
19 Oktober 1989

42



XII and was used to immunize BALB/c AnShk mice. Splenocytes from the immunized mice were fused with SP2/O-Ag¹⁴ cells, and resulting hybridomas were screened with std. techniques. The 3 MAbs obtained were purified by protein A chromatog. and characterized. The MAbs inhibited human blood-coagulation factor XII coagulant activity, as well as blocked the ability of blood-coagulation factor XIII to cleave prekallikrein. The MAbs also blocked the ability of blood-coagulation factor XIIIa to cleave and activate blood-coagulation factor XI.

113: 38752m Bispecific antibodies with arms for type 1 ribosome-inactivating protein and for a target-cell surface marker, their preparation, and their use in tumor immunotherapy. Glennie, Martin John PCT Int. Appl. WO 89 11,863 (Cl. A61K39/395), 14 Dec 1989, GB Appl. 88/13,527, 08 Jun 1988; 41 pp. The title antibodies (Abs) are F(ab')₂ Abs, e.g. a bispecific F(ab')₂ Ab. The 1st Fab' arm is specific for saporin or momordin, and the 2nd Fab' arm is specific for a tumor marker, e.g. a T-cell antigen receptor, or for the envelope coat protein of human immunodeficiency virus (HIV). Prepn. of the title Abs comprises (1) disocg. a F(ab')₂ Ab fragment specific for type 1 ribosome-inactivating protein into its 2 component Fab' arms, (2) disocg. a F(ab')₂ Ab fragment specific for the target cell marker into its 2 component Fab' arms, and (3) linking an Fab' arm of (1) and an Fab' arm of (2). A population of cells can be depleted by administration of an effective amt. of such Abs. Prodn. of 2 monoclonal antibodies (MAbs) (DB7-12 and DB7-18) and polyclonal Abs against saporin is also described. Thus, a dispecific F(ab')₂ Ab was constructed in which one arm was from a mouse IgG, specific for the IgM idiotype of L₂C lymphoblastic leukemia cells and the 2nd arm was from MAb DB7-18. ³H-labeled leucine incorporation into proteins was inhibited in L₂C cells grown in medium supplemented with a sub-toxic concn. of saporin and the dispecific Ab. The IC₅₀ was close to 4 ng/mL. The bispecific Ab was most effective when the Ab/saporin molar ratio was ~3:1. Compared to the rapid clearance of saporin from guinea pig plasma, the clearance of the bispecific Ab was slow (half-life approx. 17 h). The bispecific Ab and saporin increased the survival rate of leukemic guinea pigs.

113: 38753n Recombinant vectors for generation of chimeric antibodies in murine hybridomas. Neumaier, Michael PCT Int. Appl. WO 90 00,616 (Cl. C12P21/00), 25 Jan 1990, US Appl. 216,674, 07 Jul 1988; 35 pp. Chimeric antibodies formed by joining murine antigen-specific Ig variable regions to human Ig const. regions are useful for human diagnosis and therapy. Recombinoma vectors contain a transcriptionally inactive Ig gene consisting of murine variable and human const. region sequences are described. These vectors provide a gene for homologous recombination to occur at the natural locus of an active Ig gene of a murine hybridoma. The end result is that chimeric monoclonal antibodies with human const. regions and murine variable regions are made by the transfected hybridoma cells.

113: 38754p Monoclonal antibody to B5 antigen of human erythrocytes. Rinksher Ltd. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 02 00,299 [90 00,299] (Cl. C12N15/00), 06 Jan 1990, GB Appl. 87/29,304, 16 Dec 1987; 7 pp. Some human cancer patients (e.g. mammary gland tumor) showed an agglutinating antigen (termed B5 antigen) on their erythrocytes. Regression of the cancers sometimes correlated with a lower titer of B5. The B5 antigen was identified by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis as having mol. wt. ~35,000. Monoclonal antibody specific to B5 antigen was prepd. by the hybridoma method. The N-terminal 23 amino acid residues are reported.

113: 38755q Monoclonal antibody to myeloma cells and its use in histoimmunological diagnosis. Takeuchi, Tamotsu; Kubonishi, Ichiro; Myoshi, Isao (Eisai Co., Ltd.) Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 02 31,692 [90 31,692] (Cl. C12P21/00), 01 Feb 1990, Appl. 88/182,574, 21 Jul 1988; 7 pp. Spleen cells from human myeloma cell-immunized animals (mice) are fused to myeloma cells to form a hybridoma for the prodn. of a monoclonal antibody that specifically binds to a ~47-kD protein in human myeloma cells. The monoclonal antibody was used in the detection of human myeloma, adult T-cell leukocytic lymphoma, etc. by histoimmunostaining.

113: 38756r Antibodies to dihydropyridine receptor. Campbell, Kevin P.; Imagawa, Toshiaki; Leung, Albert T. (Miles, Inc.) U.S. 4,912,202 (Cl. 530-387; C07K15/00), 27 Mar 1990, Appl. 1,788, 08 Jan 1987; 5 pp. Murine monoclonal antibodies capable of immunopptg. labeled dihydropyridine receptor material from the Ca channel from digitonin-solubilized skeletal muscle triads were developed. The antibodies recognize a 170,000 dalton protein subunit of the dihydropyridine receptor.

113: 38757s High affinity monoclonal antibodies to Bowman-Birk inhibitor and immunoassay methods. Brandon, David L.; Bates, Anne H.; Friedman, Mendel (United States Dept. of Commerce) PCT Int. Appl. WO 90 03,574 (Cl. G01N33/53), 05 Apr 1990, US Appl. 246,842, 20 Sep 1988; 40 pp. Hybrid cell lines (hybridomas) which produce and secrete high affinity monoclonal antibodies specific for Bowman-Birk inhibitor (BBI) were developed. High affinity antibodies to BBI have one or more of the following characteristics: (1) they are specific to the active form of BBI, i.e. they react and bind with undenatured BBI, but do not bind with BBI which has been denatured by heat or disulfide exchange; (2) they do not react and bind with Kunitz trypsin inhibitor; (3) they distinguish classical BBI from other BBI's, including lima bean protease inhibitor; and (4) they bind BBI-protease complex, e.g. BBI-chymotrypsin. Immunoassay methods using the monoclonal antibodies to analyze BBI specifically in plant, animal, or human tissue or fluid or foodstuffs and techniques for immunoaffinity binding of BBI are proposed.

113: 38758t Liposome-encapsulated interferons for treating bladder cancer. Fidler, Isaiah; Johnson, John; Nayar, Rajiv; Killian, Jerald Jay (University of Texas System) Eur. Pat. Appl. EP 331,635 (Cl. A61K45/02), 06 Sep 1989, US Appl. 162,241, 29 Feb 1988; 20 pp. Human bladder cancer cells are sensitive to liposome-encapsulated α -interferon hybrids. Examples are given of the prepn. of phospholipid liposomes and the encapsulation of interferons therein.

113: 38759u Isoforms of trophoblastin, new interferons composed of said isoforms, their manner of production, and applications. Martal, Jacques; Charnigny, Gilles; Gage, Pierre; Pernollet, Jean Claude; Charlier, Madia; Guillemot, Michel; Huet, Jean Claude; Renaud, Pierrette; Hue, Dominique; et al. (Institut National de la Recherche Agronomique) PCT Int. Appl. WO 89 08,706 (Cl. C12N15/00), 21 Sep 1989, FR Appl. 88/3,591, 18 Mar 1988; 47 pp. Isoform of trophoblastin having N-terminal amino acid sequences: Cys-Tyr-Leu-Ser-(X)-Arg-Leu-Met-Leu-Asp-Ala-(U)-Glu-Ans-Leu-Lys-Leu-Leu-Asp-Arg-Met-Ans-Arg-Leu-Ser-Pro-His-Ser-Cys-Leu-Gln-Asp-Arg-Lys-(Y)-Phe-Gly-Leu-Pro-Gln-Glu-Met-Vai-(Z)-Gly-Asp-Gln-(W)-(V)-Lys-Asp-Gln-Ala-Phe-Pro are isolated and purified from mammal conceptus. The trophoblastins belong to class II for interferon α and have antiviral, antiproliferative, antitumor, immunomodulatory activities, etc. Cloning of the isoforms, oligonucleotide probes contg. trophoblastin cDNA, a kit for detecting embryo viability, and use of the isoforms in human and veterinary medicine and to protect embryos during transfer are disclosed. Sheep embryos were cultured and trophoblastin isoforms 1-5 were purified from the culture fluid by HPLC on DEAE 5 PW. Antiviral activity against vesicular stomatitis virus infection in bovine MDBK cells was 0.6×10^6 , 0.8×10^6 , and 0.7×10^6 IU (based on human interferon)/mg protein for isoforms 1-3, resp. An RIA using antiserum to purified sheep trophoblastin could detect 15 pg/100 μ L sample.

113: 38760a Purification and characterization of human tumor necrosis factor α inhibitor. Dayer, Jean Michel; Seckinger, Philippe Lucien (Glaxo Group Ltd.) Ger. Offen. DE 3,910,323 (Cl. C12N1/20), 19 Oct 1989, GB Appl. 88/7,803, 31 Mar 1988; 19 pp. Human tumor necrosis factor- α inhibitor (TNFI) is purified and characterized. TNFI can be used to treat diseases related to overprodn. or unregulated prodn. of tumor necrosis factor- α (TNF). The glycoprotein was purified from urine of fever patients by (NH₄)₂SO₄ pptn., anion and cation exchange chromatog., gel filtration, affinity chromatog., and reversed-phase HPLC. Two forms were identified, with mol. wts. 40-60 and 33 kilodaltons. Both had a pl of 5.5-6.1; inhibited TNF cytotoxicity to L929 cells; inhibited TNF-induced PGE₂ release by human fibroblasts and synovial cells; and inhibited TNF binding to U937 cells. TNFI had no proteolytic activity. The N-terminal amino acid sequence was detd.

113: 38761p Method using γ -interferon for preventing the development or decreasing the extent of malarial parasitemia. Ferreira Vigouroux, Arturo; Nussenzeig, Victor (New York University) U.S. 4,915,941 (Cl. 424-85.5; A61K45/02), 10 Apr 1990, Appl. 940,510, 11 Dec 1986; 11 pp. A method for inhibiting development of or limiting extent of malarial parasitemia in mammals invaded by *Plasmodium* sporozoites comprises administration of a parasitemia-inhibiting amt. of γ -interferon (I) no later than the end of the prepatency period of the mammal or the dormant phase of the parasite. A DNA hybridization probe useful for detn. of sporozoite infectivity is also described. Thus, using a 2.2 kilobase repetitive *P. berghei* DNA probe to det. *P. berghei* DNA in blood samples, the effect of serial dilns. of I was detd. in mice injected 5 h later with sporozoites obtained from salivary glands of *Anopheles stephensi*. Mice injected once with the largest amt. of I did not develop detectable parasite DNA until approx. the 5th day after infection. Treatment of rats with I prior to injection of sporozoites inhibited development of extraerythrocytic forms of *P. berghei*. Treatment with I also led to a considerable delay in the appearance of parasites in the blood and increased the prepatent period over control animals in *P. vivax* sporozoite-challenged chimpanzees.

For papers of related interest see also Section:

1 34410a Effects of ofloxacin on cell-mediated immune response and lymphokine production.

34425j Cycloheximide-induced modulation of TNF-mediated cytotoxicity in sensitive and resistant ovarian tumor cells.

34431b Immunotoxins of *Pseudomonas* exotoxin A (PE): effect of linkage on conjugate yield, potency, selectivity and toxicity.

34436p Artificial reversion of acute myeloid leukemia cells into normal phenotype.

34464w Nonsteroidal antiinflammatory agents inhibit upregulation of CD11b, CD11c, and CD35 in neutrophils stimulated by formyl-methionine-leucine-phenylalanine.

34494f A bispecific antibody enhances the fibrinolytic potency of single-chain urokinase.

34665a Suramin prevents binding of interleukin 2 to its cell surface receptor: a possible mechanism for immunosuppression.

2 34782y Radioimmunoassay of the anti-cancer agent 4-hydroxy-androstenedione in body fluids.

34816a The enhancement of polyclonal T cell proliferation by beta-endorphin.

34857b Characterization and manipulation of the endocrine environment during gestation in mice and effects on the immune system of offspring.

34861y The role of the thymus in the enhancement of humoral

DE 39 103 23 A 1

X